

MARIANE CRISTINA FLORES NASCIMENTO

**“PESQUISA DE MICROPARTÍCULAS PLAQUETÁRIAS
CIRCULANTES EM INDIVÍDUOS COM TROMBOSE
VENOSA PROFUNDA, SÍNDROME DO ANTICORPO
ANTIFOSFOLIPÍDEO OU FATOR V DE LEIDEN”**

CAMPINAS

2007

MARIANE CRISTINA FLORES NASCIMENTO

**“PESQUISA DE MICROPARTÍCULAS PLAQUETÁRIAS
CIRCULANTES EM INDIVÍDUOS COM TROMBOSE
VENOSA PROFUNDA, SÍNDROME DO ANTICORPO
ANTIFOSFOLIPÍDEO OU FATOR V DE LEIDEN”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia
Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular,
Molecular e do Desenvolvimento.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

N17p Nascimento, Mariane Cristina Flores
“Pesquisa de micropartícula plaquetárias circulante em indivíduos com trombose venosa profunda, síndrome do anticorpo antifosfolípido ou fator V de Leiden” / Mariane Cristina Flores Nascimento. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Joyce Maria Annicchino-Bizzacchi
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas (Sangue). 2. Trombose venosa. 3.
Micropartículas. I. Annicchino-Bizzacchi, Joyce Maria. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em inglês : Avaluation of circulating platelet-derived microparticles in deep venous thrombosis, antibody antiphospholipid syndrome or Leiden Factor V)

Keywords: • Platelets
• Venous thrombosis
• Microparticles

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Banca examinadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annicchino-Bizzacchi
Profa. Dra. Dayse Maria Lourenço
Prof Dr Vagner de Castro**

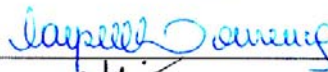
Data da defesa: 22- 06 -2007

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

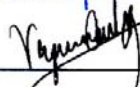
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

Membros:

1. Prof(a) Dr(a) DAYSE MARIA LOURENÇO -



2. Prof(a) Dr(a) VAGNER DE CASTRO -



3. Prof(a) Dr(a) JOYCE MARIA A.-BIZZACCHI -



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/06/2007

DEDICATÓRIA

À Ana Maria Flores.

A Deus

À minha família: Helena, Aninha, Ana Maria, Marilene, Silvia, Joaquim e Rogério, que me trouxeram até aqui com muito amor, apoio incessante e incondicional, sabendo sempre compreender os longos períodos de ausência.

À Dra. Joyce, por acreditar em meu potencial, me oferecendo esta imensa oportunidade de crescimento pessoal e profissional, sempre imerso em muito carinho, respeito e dedicação.

Aos pacientes e controles, que acreditaram na importância da pesquisa.

Aos amigos: Maria Néri, Gabriela, Tatiana, Regina, Henrique, Mariza, Richelli, Luiza, Maria Luiza e Carla, pelo apoio e companheirismo sem limites.

Aos amigos do Laboratório de Hemostasia: Tânia, Silmara, Ricardo, Rafael, Susan, Lúcia Helana, Devanira, Cristina, Andrey, Aline, Ana Cláudia, Eloá, Luís Fernando, Erich, Graziela, Michelle, Carolina, Vagner, Guilherme, Tayana, Janaína, Josie, Daniela, Aranha, Suley e Fernanda: pelas ajudas e ensinamentos sempre oportunos e salvadores, pelo carinho, incentivo e amizade.

À Dra. Irene, Fernanda, Miriam e Suiellen, pela ajuda imprescindível à realização da Citometria de Fluxo.

Aos funcionários da Unidade de Pronto Atendimento do Hospital das Clínicas da UNICAMP: Dr. Élcio, Dr. Marcos e residentes da Cirurgia, pela ajuda nas coletas de pacientes com trombose aguda.

Aos funcionários do Ambulatório de Hemostasia e Hematologia do Hemocentro da UNICAMP: Marlene, Marcos, Cássia, Neli, pela ajuda e apoio constantes.

À Roberto Zulli pela ajuda na análise estatística, disponibilidade, atenção e ensinamentos.

Aos funcionários do Hemocentro da UNICAMP: Patrícia e Ana Lúcia, pela atenção, colaboração e amizade.

À Dra. Sara Terezinha Ollala Saad, Dra. Íscia Terezinha Lopes Cendes e Dr. Lício Augusto Velloso, pela atenção e pelos valiosos ensinamentos recebidos no exame de qualificação.

À Fapesp e à Capes, que proporcionaram ajuda financeira essencial para a realização deste estudo.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP, através do processo 05/53547-0.

Responsável: Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT	<i>xli</i>
1- INTRODUÇÃO	45
1.1- Trombose venosa	47
1.2- Plaquetas e trombose venosa	48
1.3- Micropartículas plaquetárias e trombose venosa	49
2- OBJETIVOS	55
3- CASUÍSTICA	59
3.1- Casuística	61
3.1.1- Pacientes.....	61
3.1.1.1- Critérios de inclusão de pacientes com TVP.....	61
3.1.1.2- Critérios de exclusão de pacientes com TVP.....	62
3.1.1.3- Critérios de inclusão de pacientes com SAF.....	62
3.1.1.4- Critérios de exclusão de pacientes com SAF.....	62
3.1.2- Controles.....	63
3.1.3- Critérios de exclusão de controles.....	63
4- MÉTODOS	65
4.1-Coleta, preparação das amostras e separação das MPs	67
4.2-Citometria de fluxo	67
4.2.1-Quantificação das MPs.....	67
4.2.2-Caracterização das MPs.....	69

4.3- Fragmento 1+2 de protrombina.....	71
4.3.1- Plasma.....	71
4.3.2- Micropartículas.....	72
4.4- Dosagem de dímeros-D.....	72
4.4.1- DD2 com o número total de MPs.....	73
4.4.2- DD2 com a correção do número de MPs.....	74
4.5- Teste de geração de trombina.....	74
4.6- Análise estatística.....	78
5- RESULTADOS.....	79
5.1- Características clínicas.....	81
5.2- Citometria de fluxo.....	82
5.2.1- Pre-análise da quantificação e caracterização das MPs.....	82
5.2.2- Quantificação das MPs.....	83
5.2.3- Caracterização das MPs.....	84
5.3- Fragmento 1+2 de protrombina.....	91
5.3.1- Plasma.....	91
5.3.2- Micropartículas.....	93
5.4- Dosagem de D-dímeros.....	96
5.5- Teste de geração de trombina.....	100
6- DISCUSSÃO.....	105
7- CONCLUSÕES.....	115
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
9- ANEXO.....	129
10- APÊNDICES.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
ADP	Adenosina difosfato
APC	Aloficocianina
BSA	Soro albumina bovina
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CTR	Controles
DD2	Dímeros-D
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELFA	Enzyme linked fluorescent assay
et al.	E outros (as)
F1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FITC	Isitiocianato de fluoresceína
FSC	Forward scatter
FV	Fator V
FVL	Fator V de Leiden
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
L	Litros
mL	Mililitros

mmol	Milimoles
MPs	Micropartículas
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
nmol	Nanomoles
PBS	Tampão fosfato
PBS/CaCl₂	Tampão fosfato acrescido de cloreto de cálcio
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Piridina de Clorofila
PI	Iodeto de propídio
PPP	Plasma pobre em plaquetas
rpm	Rotações por minuto
SAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípide
SSC	Side scatter
TCK	Tempo de coagulação com caulin
TEV	Tromboembolismo venoso
TGT	Teste de geração de trombina
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo tromboplastina parcial ativada
TVP	Trombose venosa profunda
U	Unidades

	PÁG.
Tabela 1- Esquema utilizado na preparação das amostras visando a identificação de células em meio às MPs por Citometria de Fluxo.....	69
Tabela 2- Esquema utilizado na preparação das amostras visando a identificação da origem celular das MPs por Citometria de Fluxo.....	69
Tabela 3- Média e desvio-padrão (DP) das idades dos pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses do evento trombótico, SAF/TVP, indivíduos com FVL e seus respectivos controles pareados.....	81
Tabela 4- Classificação dos indivíduos em relação ao sexo e etnia de acordo com o grupo de estudo: pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses do evento trombótico, SAF/TVP, indivíduos com FVL Os controles têm a mesma distribuição por serem pareados por esses parâmetros.....	81
Tabela 5- Resultados das medianas (mínimo-máximo) do número de MPs/L de plasma em pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses de tratamento, SAF/TVP e indivíduos com FVL.....	83
Tabela 6- Comparações entre o número de MPs/L de plasma no grupo total de pacientes com TVP (TVP 6 meses + TVP diagnóstico + SAF/TVP), ou nos subgrupos de TVP, com o grupo controle total (CTR total).....	84

Tabela 7-	Comparação entre a porcentagem de MPs (eventos anexina V positivos) e seus valores mínimos e máximos, em pacientes e controles.....	85
Tabela 8-	Comparação entre a porcentagem de MPs (eventos anexina V positivos) e seus valores mínimos e máximos, em pacientes e grupo controle total (CTR total).....	86
Tabela 9-	Comparação entre as porcentagens de MPs de origem eritrocítica (eventos duplo positivos para CD235 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.....	86
Tabela 10-	Comparação entre as porcentagens de MPs de origem plaquetária (eventos duplo positivos para CD61 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.....	87
Tabela 11-	Comparação entre as porcentagens de MPs de origem monocítica (eventos duplo positivos para CD14 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.....	88
Tabela 12-	Comparação entre as porcentagens de MPs de origem endotelial (eventos duplo positivos para CD31 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.....	89
Tabela 13-	Comparação entre as porcentagens de MPs de origem leucocitária (eventos duplo positivos para CD45 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.....	90
Tabela 14-	Comparação entre as porcentagens de MPs que expressam Fator Tecidual (eventos duplo positivos para anti-TF e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.....	90

Tabela 15-	Comparação entre a dosagem de F 1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP 6 meses), SAF/TVP e FVL comparados com seus controles pareados. Os resultados foram expressos em nmol/L.....	91
Tabela 16-	Dosagens de F 1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP 6 meses), SAF/TVP e FVL comparados com grupo de indivíduos controles total (CTR total). Os resultados foram expressos em nmol/L.....	92
Tabela 17-	Dosagens de F 1+2 em <i>pool</i> de plasmas incubados com MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP 6 meses), SAF/TVP e FVL comparados com grupo de controles pareados. Os resultados foram expressos em nmol/L.....	94
Tabela 18-	Dosagens de F1+2 em <i>pool</i> de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico, SAF/TVP e FVL comparadas àquela do grupo de indivíduos controles total (CTR total). Os resultados foram expressos em nmol/L.....	95
Tabela 19-	Dosagens de DD2 em <i>pool</i> de plasma de indivíduos saudáveis em presença de 25µL de MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e seus respectivos controles. Os resultados foram expressos em ng/mL.....	96
Tabela 20-	Dosagens de DD2 em <i>pool</i> de plasma de indivíduos saudáveis em presença de 25µL de MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e grupo controle total. Os resultados foram expressos em ng/mL.....	98

Tabela 21-	Dosagens de DD2 em <i>pool</i> de plasma de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico, SAF/TVP, FVL e seus respectivos controles. Os resultados foram expressos em ng/mL.....	99
Tabela 22-	Dosagens de DD2 em <i>pool</i> de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico, SAF/TVP, FVL e mediana do grupo controle total (CTR total). Os resultados foram expressos em ng/mL.....	100
Tabela 23-	Valores da área sob a curva do TGT com 10µL MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP, comparados com o <i>pool</i> de seus controles pareados. Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.....	101
Tabela 24-	Valores da área sob a curva formada no TGT em presença de 10µL MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP comparados ao <i>pool</i> do grupo total de controles (CTR total). Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.....	101
Tabela 25-	Valores da área sob a curva formada no TGT em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP comparados com o <i>pool</i> de seus controles pareados. Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.....	102
Tabela 26-	Valores da área sob a curva formada no TGT com 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP comparadas ao grupo total de controles (CTR total). Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.....	103

	PÁG.
Figura 1- <i>Dot plot</i> obtido em citometria de fluxo. A delimitação do <i>gate</i> teve como objetivo a seleção da população anexina V positiva (R1).....	68
Figuras 2 a 4- <i>Dot plots</i> representativos obtidos em citometria de fluxo. Fig. 2) Plot SSC versus Anexina V: Eventos Anexina V positivos isolados de total de eventos contidos em P1. Fig. 3) MPs derivadas de eritrócitos (duplo positiva CD235 e Anexina V) contida em P6. Fig. 4) MPs derivadas de plaquetas (população duplo positiva CD61 e Anexina V) contida em P4.....	70
Figura 5- <i>Dot plot</i> da análise obtida por citometria de fluxo com anexina V, em que se observa que a população selecionada possui tamanho reduzido, compatível ao tamanho das MPs....	82
Figura 6- <i>Dot plot</i> da análise obtida por citometria de fluxo, no qual se observa apenas uma população, sendo ela positiva para anexina V e negativa para PI (quadrante 2).....	83
Figura 7- Representação gráfica das porcentagens de MPs (eventos positivos para anexina V) em pacientes com SAF comparados com seus respectivos controles pareados.....	85
Figura 8- Representação gráfica das porcentagens de MPs de origem plaquetária (eventos duplo positivos para CD61 e anexina V) em pacientes com SAF comparados com seus respectivos controles pareados.....	87

Figura 9-	Representação gráfica das porcentagens de MPs de origem endotelial (eventos duplo positivos para CD31 e anexina V) em pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com seus respectivos controles pareados.....	89
Figura 10-	Curva utilizando-se os padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2.....	91
Figura 11-	Dosagens de F1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP), SAF/TVP (SAF), FVL e, seus controles pareados (CTR). Os resultados foram expressos em nmol/L.....	92
Figura 12-	Dosagem do fragmento 1+2 de protrombina (F1+2) em <i>pool</i> de plasma de pacientes com SAF/TVP comparados com o grupo de controles total (CTR total).....	93
Figura 13-	Curva utilizando-se os padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2.....	93
Figura 14-	Dosagem do F1+2 em <i>pool</i> de plasma de doadores de sangue incubados por 10 minutos com MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP), SAF/TVP (SAF), FVL e, seus controles pareados (CTR). Os resultados foram expressos em nmol/L.....	94
Figura 15-	Representação gráfica das dosagens de F 1+2 em <i>pool</i> de plasma de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com SAF/TVP comparados com grupo de indivíduos controles total (CTR total).....	95
Figura 16-	Representação gráfica das dosagens de F 1+2 em <i>pool</i> de plasma de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com FVL comparados com grupo de indivíduos controles total (CTR total).....	96

Figura 17-	Representação gráfica da dosagem de D-dímero (DD2) em <i>pool</i> de indivíduos saudáveis em presença de 25µL de MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com seus controles pareados (CTR).....	97
Figura 18-	Representação gráfica da dosagem de D-dímero (DD2) em <i>pool</i> de indivíduos saudáveis em presença de 25µL MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com o grupo de controles total (CTR total).....	97
Figura 19-	Representação gráfica da dosagem de D-dímero (DD2) em <i>pool</i> de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com seus controles pareados (CTR).....	98
Figura 20-	Representação gráfica dos valores da área sob a curva formada no teste de geração de trombina em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses comparados ao grupo total de controles (CTR total).....	103

RESUMO

A Trombose Venosa Profunda (TVP) é uma doença multicausal, mas muitos fatores de risco ainda não estão definidos. Micropartículas (MPs) são pequenas vesículas liberadas da membrana celular durante ativação e apoptose. MPs podem ser um reflexo da dinâmica entre repouso, ativação e morte celular e podem contribuir com a gravidade da doença pois são procoagulantes e pro-inflamatórias. Parece haver associação entre elevado número de MPs e risco de complicações tromboembólicas, que podem ter um papel na patogênese destas doenças. Neste estudo avaliamos e caracterizamos as MPs em pacientes com TPV de membro inferior, [ao diagnóstico (5M/4H, idade média=41,1 anos), após 6 meses de tratamento (7M/3H, idade média=32,9 anos), associada à Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (7M/3H, idade média=33,8 anos)], em portadores assintomáticos do Fator V de Leiden (FVL) (7M, idade média=34 anos), e comparando-as a controles pareados por sexo, idade e etnia. As MPs foram isoladas de sangue periférico citratado, por centrifugação diferencial. A quantificação e caracterização foram feitas por citometria de fluxo usando os anticorpos: CD235, CD61, CD45, CD31, CD14, CD45, anti-TF e Anexina V. A atividade procoagulante plasmática foi investigada pela dosagem do fragmento 1+2 de protrombina (F1+2). A atividade procoagulante das MPs foi analisada pela dosagem de F1+2, de Dímero-D (DD2) e pelo teste de geração de trombina (TGT) em *pool* de indivíduos saudáveis em presença de MPs, corrigidas ou não por número na amostra (10.000 MPs). A análise estatística empregou os testes Wilcoxon ou U de Mann-Whitney, $\alpha=0.05$. O número de MPs não esteve diminuído em nenhum dos grupos estudados. A porcentagem de MPs estava estatisticamente aumentada nos pacientes com SAF/TVP em relação a seus controles ($P=0,007$). Observou-se um aumento significativo das MPs plaquetárias nos pacientes com SAF/TVP ($P=0,01$) e diminuição das MPs endoteliais naqueles com TVP ao diagnóstico ($P=0,03$), quando comparados aos seus controles. Os pacientes com SAF/TVP apresentaram diminuição significativa do F1+2 plasmático, tanto em relação aos seus controles ($P=0,008$) como ao CTR total ($P=0,002$). O F1+2 gerado pelas MPs estava significativamente diminuído em indivíduos com FVL em relação ao CTR total (0,009), e em pacientes com SAF/TVP em relação aos seus controles ($P=0,001$), e ao CTR total ($P=0,008$). O DD2 em *pool* de plasma, independente do número de MPs, estava significativamente aumentado na comparação entre TVP ao diagnóstico e seus controles ($P=0,008$) e ao CTR total ($P=0,0001$). O DD2 em *pool* com número corrigido de MPs

apresentava-se aumentado significativamente nos pacientes com TVP ao diagnóstico quando comparados aos seus controles ($P=0,008$). Os valores do TGT com número corrigido de MPs estavam estatisticamente diminuídos em pacientes com TVP após 6 meses ($P=0,01$), em comparação ao CTR total. Nossos resultados demonstraram que o número de MPs está alterado em pacientes com TVP, e talvez possam ter um papel, particularmente após o evento trombótico ou em presença de anticorpos antifosfolípidos. As MPs demonstraram atividade procoagulante, principalmente ao diagnóstico de TVP, podendo contribuir ou agravar o quadro clínico do paciente.

ABSTRACT

Deep Venous Thrombosis (DVT) is a multicausal disease, but many risk factors are not well defined. Microparticles (MPs) are small blebs released from cellular surfaces during activation and apoptosis. MPs may be the consequence of the dynamics between rest, activation and cellular death and can contribute to the seriousness of the illness and are therefore procoagulant and pro-inflammatory. There seems to be an association between high numbers of MPs and risk of thromboembolic complications and these may have a role in pathogenesis of these illnesses. In this study, we evaluated and characterized the MPs in patients with DVT of inferior limbs, [at diagnosis (5M/4H, medium age= 41.1 years), after 6 months of treatment (7M/3H, medium age= 32.9 years), and associated to Antibody Antiphospholipid Syndrome (7M/3H, medium age= 33.8 years)], and asymptomatic carriers of Factor V Leiden (FVL) (7M, medium age 34= years), matched to health controls by sex, age and ethnic origin. The MPs were isolated from citrated peripheral blood, by differential centrifugation. The quantification and characterization were performed by flow cytometry using the antibodies: CD235, CD61, CD45, CD31, CD14, CD45, anti-TF and Annexin V. The plasmatic procoagulant activity was investigated by prothrombin fragment 1+2 (F1+2) dosage. The MPs procoagulant activities were analyzed by F1+2 dosage, D-dímer (DD2) and Thrombin Generation Test (TGT) in a *pool* of healthy individuals in the presence of MPs, corrected or not for number in the sample (10.000 MPs). Statistical analysis was performed by Wilcoxon or the Mann-Whitney tests, $\alpha=0.05$. The MPs number were not lower in any of the studied groups. The MPs percentage was statistically increased in the SAF/DVT patients compared to their matched controls ($P=0.007$). A significant increase in the platelet-derived MPs in SAF/DVT patients ($P=0.01$) and a reduction in the endothelial-derived MPs at diagnosis were observed ($P=.03$), when compared to their matched controls. The SAF/TVP patients show a significant reduction in plasmatic F1+2, when compared to their matched controls ($P=0.008$) and to the total CTR ($P=0.002$). The F1+2 generated by MPs were significantly lower in FVL carriers compared to the total CTR (0.009), and in SAF/DVT patients compared to their controls ($P=0.001$), and to the total CTR ($P=0.008$). The DD2 in the *pool* of plasma, independently of the number MPs, was significantly higher in DVT at diagnosis when compared to their matched controls ($P=0.008$) and the total CTR ($P=0.0001$). The DD2 in the *pool* with corrected MPs number was significantly higher in DVT at diagnosis

patients when compared to their matched controls ($P=0,008$). The values of TGT in corrected MPs number were statistically lower in patients with DVT after 6 months ($P=0.01$), in comparison to the total CTR. Our results demonstrated that the number of MPs is modified in patients with DVT, and may play a role, particularly after the thrombotic event or in association with antiphospholipid antibodies. The MPs demonstrated procoagulant activity, especially at DVT diagnosis, and were able to contribute or to aggravate the patient's clinical situation.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Trombose venosa

A trombose é definida como o processo patológico resultante da ativação e propagação inapropriada da resposta hemostática normal do organismo, podendo envolver tanto o território venoso quanto o arterial. O tromboembolismo venoso (TEV) é considerado uma doença comum, com incidência de 1 a 3 casos por 1000 indivíduos/ano (Silverstein et al, 1998; Hanson et al, 1997). Estudos realizados na população brasileira, apesar de limitados, também mostram que o TEV tem importância em nosso país, com prevalência de 0,6 casos para cada 1000 habitantes (Maffei, 1995).

A trombofilia é caracterizada como uma tendência à trombose, decorrente de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos. Os fatores de risco adquiridos já estabelecidos são: imobilização, gravidez, câncer, uso de estrógeno/progesterona, trauma, cirurgia, presença de anticorpo antifosfolípido (SAF), dentre outros (Rosendaal, 1999; Robertorye & Rodgers, 2001). A idade é um fator de risco adquirido importante para TVP, e isto é mais evidente após 50 anos, em que há um aumento na incidência de TEV, com um pequeno predomínio no sexo masculino (Cushman, 2007).

A trombofilia hereditária decorre de defeitos genéticos que comprometem os mecanismos de anticoagulação, sendo classificados em deficiência de proteína C, de proteína S, da antitrombina, mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden), e a mutação G20210A no gene da protrombina. Estas deficiências manifestam-se mais frequentemente como fenômenos tromboembólicos venosos, muitas vezes desencadeados por fatores de risco adquiridos (Rosendaal, 1999; Robertorye & Rodgers, 2001).

É importante ressaltar que em aproximadamente 30% dos pacientes com TEV não se identifica nenhum fator adquirido ou hereditário (Heijboer e cols. 1990; Poort e cols. 1996; Rosendaal e cols. 1995), fato que sugere a presença de mecanismos adicionais ainda desconhecidos na etiologia da doença.

1.2- Plaquetas e trombose venosa

Há poucas evidências sobre o papel da hiperatividade plaquetária e trombose venosa profunda (TVP) (van Hulsteijn et al, 1982). Poucos relatos descrevem que a ativação plaquetária pode estar envolvida no mecanismo fisiopatológico da trombose venosa.

Na oclusão da veia central de retina associada à hiperhomocisteinemia ou a presença de anticorpos antifosfolipídios, a ativação plaquetária é um fator determinante no processo oclusivo. Recentemente, um estudo demonstrou prevalência diminuída dos alelos CC/GG (menor ativação plaquetária) dos polimorfismos C807T/G873A no gene da glicoproteína GpIa/IIa nesses pacientes, em comparação a um grupo controle normal, sugerindo que este polimorfismo pode estar associado à patogênese da trombose (Dodson et al, 2003).

Leoncini et al (2007) mostraram que indivíduos saudáveis possuem plaquetas menos responsivas à ativação pelo colágeno ou adenosina difosfato (ADP) quando comparados a indivíduos com antecedente de oclusão de veia central de retina. Assim, o fenômeno trombótico ocorreria em decorrência da ação estimuladora do colágeno sobre a ativação e a agregação plaquetária, o que levaria a um aumento da fosforilação da tirosina de enzimas sinalizadoras específicas tais como p72syk e PLC γ 2, pelo aumento intracelular de níveis de cálcio e pela redução da formação de óxido nítrico.

Prandoni et al (2003) avaliaram a presença de aterosclerose carotídea assintomática em pacientes com trombose venosa espontânea, e verificaram que o acometimento arterial é mais freqüente nesses pacientes, quando comparados a controles normais ou com trombose venosa secundária. Esses resultados sugerem que a doença aterosclerótica pode predispor à trombose venosa espontânea, ou que as duas condições apresentam fatores etiopatogênicos comuns.

Moléculas de adesão regulam a migração leucocitária na circulação durante o processo inflamatório. A P-selectina é um componente dos grânulos- α plaquetários e dos corpos de Weibel-Palade da célula endotelial. Uma forma solúvel dessa proteína está

presente no plasma e, há um aumento desses níveis quando ocorre ativação plaquetária (Jilma et al, 1996; Blann et al, 1997). Altos níveis foram descritos em diabetes, aterosclerose e em situações de trombose associada ao consumo plaquetário, mas sem correlação com o número de plaquetas circulantes (Chong et al, 1994; Jilma et al, 1996). A análise desta proteína em pacientes com TVP revelou uma concentração plasmática aumentada quando comparada a controles normais. Esses resultados tanto podem ser consequência da ativação plaquetária secundária ao aumento de trombina, gerada durante o processo trombótico, como ser um fator de risco para a TVP (Blann et al, 2000).

Bugert et al (2007) avaliaram a concentração plasmática de P-selectina e a prevalência do polimorfismo Thr715Pro no gene codificador dessa proteína e, do polimorfismo de repetição CA na região 3' do gene CD154 em pacientes com anticoagulante lúpico, subdivididos em assintomáticos, com antecedente de TVP ou, trombose arterial. A prevalência dos polimorfismos foi diferente nos pacientes com antecedente de trombose venosa ou arterial. Os níveis de P-selectina solúvel estavam significativamente maiores nos pacientes com antecedente de TEV, mas seu papel como fator causal somente poderá ser estabelecido em estudos prospectivos.

O *Antiplatelet Trialist' Collaboration* (1994) apresentou uma visão geral detalhada de testes randomizados com o objetivo de determinar a eficácia da terapia antiplaquetária na profilaxia do TEV. Os resultados mostraram uma redução no risco de TVP em pacientes de alto risco, ao redor de 35% ($p=0,03$).

1.3- Micropartículas plaquetárias e trombose venosa

Células eucarióticas podem eliminar fragmentos e componentes de sua membrana plasmática e/ou de organelas no espaço extracelular. Esses fragmentos são conhecidos genericamente como micropartículas (MPs). Diversos tipos celulares liberam essas 'vesículas' tanto como componente normal de seu desenvolvimento, eliminando componentes desnecessários à vida madura, quanto após ativação, de maneira regulada (Denzler et al, 2000; Raposo et al, 1997; Olas et al, 2002).

O estudo do fenômeno de liberação de MPs demonstrou que diferentes tipos de partículas com constituintes diversos de membrana, citoplasma e organelas podem ser secretados pelas células: um primeiro e heterogêneo grupo em tamanho e forma são o dos corpos apoptóticos, resultantes da formação de "bolhas" da membrana plasmática. Este grupo de partículas, composto por grandes agregados, carrega receptores de membrana e expõe grande quantidade de fosfatidilserina em sua superfície, com papel pró-coagulante e capacidade de recrutamento de fagócitos ao sítio de apoptose (Mallat et al, 2000; Théry et al, 2001). Um segundo grupo representado por segmentos de membrana plasmática que se desprendem na forma de vesículas verdadeiras, com diâmetro entre 100 e 1000nm, carregam integrinas, glicoproteínas de membrana e sítios de ligação para fatores da cascata de coagulação. Por fim, um terceiro grupo de partículas, com diâmetro entre 40 e 100nm, recentemente vem recebendo especial atenção por se caracterizarem como reais carreadores de sinais intercelulares à distância: os exossomos, liberados por compartimentos celulares membranosos conhecidos como corpos multivesiculares que agrupam vesículas intraluminais compreendendo endossomos, lisossomos e fragmentos do sistema de Golgi (Heijnen et al, 1999; Olas et al, 2002; Denzer et al, 2000; Février & Raposo, 2004). As diferentes características de cada vesícula sugerem papéis funcionais específicos. Os exossomos têm como característica a pobreza em fosfatidilserina, mas são ricos em glicolipídios associados à membrana (Février & Raposo 2004).

Os exossomos derivados de plaquetas têm pouca interação com fatores da cascata da coagulação, mas há seletivamente um aumento da expressão de receptores envolvidos em sinalização e internalização celular: CD63, CD9 (da classe de tetraspaninas) e P-selectina (Théry et al, 2002; Février & Raposo, 2004; Janiszewski et al, 2004). Assim, fica claro que, ao lado do contato célula a célula e da secreção de proteínas solúveis, as MPs podem representar um meio adicional pelo qual as células se comunicam.

Microvesículas plaquetárias contêm várias glicoproteínas de superfície das plaquetas, e também P-selectina, as quais são translocadas dos compartimentos intracelulares para a superfície celular depois da ativação. A presença dessas glicoproteínas nas microvesículas liberadas pode ser importante para sua interação com outras células (Owens et al, 1994) ou com a fibrina (Siljander et al, 1996).

As plaquetas podem ser ativadas por diferentes agonistas que se ligam a receptores específicos da membrana. O colágeno, trombina e ADP ativam diferentes receptores transmembrana que transmitem sinais para a célula. Esses sinais induzem mudanças na concentração de outros mensageiros que vão modular a resposta celular. A estimulação das plaquetas por esses agentes não leva somente à agregação e secreção, mas também resulta na vesiculação da membrana com liberação de MPs (Horstman et al, 1999).

Uma questão importante é se as MPs são procoagulantes *in vivo*. Apesar de não totalmente esclarecido, parecem ter um efeito relevante. Além dos estudos *in vitro* (Berckmans et al, 2001; Nieuwland et al, 1997), a presença de MPs altamente procoagulantes em certas doenças coincidem com o aumento de marcadores de ativação, como o fragmento 1+2 da protrombina. Alguns estudos demonstraram uma associação entre a presença de elevado número de MPs e o risco de complicações tromboembólicas (Kahn et al, 1975; Mallat et al, 2000; Ando et al, 2002; Lee et al, 1993). *In vivo*, MPs podem transferir moléculas bioativas para outras células ou outras MPs (Barry et al, 1999), inibir a vasodilatação dependente do endotélio (Van Wijk et al, 2002), além de estimular células a produzir citocinas, moléculas de adesão celular, fatores de crescimento, fator tecidual e, modular funções endoteliais (Mesri et al, 1999). A relevância clínica de MPs derivadas de plaquetas pode ser ilustrada na Síndrome de Scott (Toti et al, 1996), na Doença de Castaman (Castaman et al, 1997) e na Trombastenia de Glanzmann (Gemmell et al, 1993), sendo que em todas estas doenças, caracterizadas por uma tendência aumentada de sangramento, além do defeito primário há diminuição na formação de MPs. Na Síndrome de Scott ocorre defeito na transdução de sinal o qual diminui a migração transmembrana e a exposição de fosfatidilserina.

As MPs estão presentes na circulação de indivíduos normais (George et al, 1986; Berckmans et al, 2001), e encontram-se em número elevado em situações de dano vascular e hipercoagulabilidade (Janiszewski et al, 2004; Diamant et al, 2002; Nieuwland et al, 1997; Mallat et al, 2000; Ando et al, 2002), como na coagulação intravascular disseminada (Holme et al, 1994), síndromes coronárias agudas (Katopodis et al, 1997), doença arterial periférica (Zeiger et al, 2000), e diabetes mellitus (Nomura et al, 2003). As MPs derivadas de células hematopoéticas contribuem para a

formação de fibrina (Chou et al, 2004) e estão presentes em grande quantidade nas placas ateroscleróticas (Mallat et al, 1999). Estes achados sugerem que as MPs podem ter um papel na patogênese destas doenças.

Indivíduos com risco elevado de doença cardiovascular apresentam hipercoagulabilidade. A ativação da coagulação requer a presença de fatores de coagulação, íons cálcio e uma superfície procoagulante. Uma característica essencial dessas superfícies é a exposição de cargas negativas fosfolípídicas, e esta é uma das características das MPs. Os fatores de coagulação ligam-se, via domínio-G1a, aos fosfolípidos carregados negativamente na presença de cálcio, formando os complexos tenase e protrombinase. As MPs derivadas de plaquetas expõem mais sítios de ligação aos fatores V, VIII, e IX ativados por área de superfície em relação à superfície das plaquetas ativadas (Berckmans et al, 2001; Giensen et al, 1999; Nieuwland et al, 1997).

In vitro as MPs podem iniciar e propagar a coagulação (Ando et al, 2002; Warkentin et al, 1994; Nomura et al, 1998). A atividade procoagulante das MPs pode ser avaliada pelo teste de geração de trombina, utilizando-se um substrato cromogênico ativado pela trombina, após a adição de cálcio, na presença das mesmas (Berckmans et al, 2001; Diamant et al, 2002). A geração de trombina na presença de MPs não é decorrente da ativação do fator XII em indivíduos normais (Berckmans et al, 2001). Por outro lado, em pacientes com septicemia e coagulação intravascular disseminada, a formação de trombina foi totalmente inibida na presença de anticorpos contra o fator tissular ou fator VII (Nieuwland et al, 2000). A geração de MPs *in vitro* levou a um aumento na ativação da proteína C, facilitando a inibição dos fatores V e VIII ativados, prevenindo a formação de trombina (Tans et al, 1991).

Outro ponto ainda não definido é se as MPs são causa ou consequência do processo metabólico/vascular. Poucos estudos avaliaram as MPs em TVP, todos eles com critérios de inclusão de pacientes pouco estridentes, os quais incluíam indivíduos em situações clínicas que sabidamente causam um aumento de MPs, como neoplasias, pós operatório, idade avançada, etc.

A relevância clínica das MPs circulantes em indivíduos normais ainda não é clara, mas pode ser um reflexo da dinâmica entre repouso, ativação e morte celular. As MPs podem contribuir para a gravidade da doença uma vez que têm atividade procoagulante e pro-inflamatória, e devem ser interpretadas como parte de uma cascata de reações em resposta a estímulos.

2- OBJETIVOS

Do exposto anteriormente são objetivos deste estudo:

Avaliar e caracterizar a presença de MPs em indivíduos com Fator V de Leiden, pacientes com Síndrome do Anticorpo Antifosfolípídeo com TVP e em pacientes com TVP ao diagnóstico e após 6 meses do tratamento.

Determinar a atividade procoagulante das MPs.

3- CASUÍSTICA

3.1- Casuística

Para este estudo foram selecionados pacientes com TVP de membro inferior, proximal ou distal, ao diagnóstico; pacientes após 6 meses do episódio de TVP de membro inferior proximal, com finalização do tratamento anticoagulante; pacientes com TVP proximal de membro inferior, com diagnóstico de SAF e indivíduos com trombofilia hereditária: mutação no gene do Fator V – Fator V de Leiden (FVL), sem TVP prévia.

Os pacientes com TVP ao diagnóstico foram selecionados da Unidade de Pronto Atendimento do Hospital das Clínicas da Unicamp e do Centro Médico de Campinas, durante o período de outubro de 2006 a março de 2007.

Os pacientes com diagnóstico de SAF e aqueles após 6 meses do episódio de TVP foram selecionados do Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro/Unicamp entre março de 2005 e março de 2006.

Os indivíduos com o FVL foram selecionados a partir dos registros do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp e, foram convocados entre março de 2005 e março de 2006.

As amostras foram coletadas após a assinatura do termo de consentimento (apêndice 2).

3.1.1- Pacientes

3.1.1.1- Critérios de inclusão de pacientes com TVP

Diagnóstico clínico de TVP espontânea de membro inferior, proximal ou distal, comprovado por eco-doppler.

3.1.1.2- Critérios de exclusão de pacientes com TVP

Diagnóstico de trombofilia hereditária ou adquirida, idade superior a 60 anos para pacientes com TVP ao diagnóstico e 50 anos para pacientes com TVP após 6 meses do evento trombótico; neoplasia, SAF, doença renal ou hepática, síndromes mieloproliferativas, ou outras patologias que sabidamente estão relacionadas ao aumento de MPs.

3.1.1.3- Critérios de inclusão de pacientes com SAF

Diagnóstico de SAF confirmado pela presença do anticorpo antifosfolípídeo em 2 determinações com intervalo mínimo de 12 semanas e, diagnóstico clínico de TVP espontânea proximal de membro inferior, comprovado por eco-doppler.

3.1.1.4- Critérios de exclusão dos pacientes com SAF

Os mesmos critérios dos pacientes com TVP foram empregados, com exceção da presença de anticorpo antifosfolípídeo e, trombose em outro sítio que não a TVP proximal em membro inferior.

3.1.1.5- Critério de inclusão de indivíduos com trombofilia assintomática

Diagnóstico comprovado da mutação G1691A no gene do FV.

3.1.1.6- Critério de exclusão de indivíduos com trombofilia assintomática

Os mesmos critérios dos pacientes com TVP foram utilizados, excetuando-se a presença do FVL.

3.1.2- Controles

Para cada paciente foi incluído um indivíduo saudável proveniente da Macro-região de Campinas, pareado por sexo, idade, origem étnica, tabagismo e uso ou não, de anticoncepcional ou reposição hormonal. A origem étnica foi definida pela cor da pele e interrogatório, investigando até a segunda geração.

3.1.3- Critério de exclusão dos controles

Foram empregados os mesmos critérios de exclusão utilizados para os pacientes, além do antecedente pessoal ou familiar de trombose venosa ou arterial em idade inferior a 50 anos.

4- MÉTODOS

4.1- Coleta, preparação das amostras e separação das MPs

Foram coletados 10mL de sangue periférico em citrato de sódio 3,2%, na proporção 9:1. O processamento da amostra foi imediato, com o atraso de alguns minutos necessários ao transporte da amostra até o laboratório em caso de coleta externa. Células, plaquetas e debris foram descartados após centrifugação a 3.000g por 20 minutos. Foram feitas alíquotas de 250µL de plasma que foram congeladas em nitrogênio líquido por 15 minutos e, armazenadas a -80°C.

Alíquotas de 250µL de plasma foram descongeladas em banho de gelo e centrifugadas a 13000g por 30 minutos. Descartou-se 225µL do sobrenadante e adicionou-se 225µL de PBS/citrato. Realizou-se uma segunda centrifugação a 13000g por 30 minutos e descartou-se 225µL do sobrenadante. O pellet contendo 25µL de suspensão de MPs foi utilizado para a realização dos testes.

4.2- Citometria de fluxo

O citômetro utilizado foi o citômetro de fluxo FACSCalibur, e o programa de análise empregado foi o CellQuest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA).

4.2.1- Quantificação das MPs

Em tubos específicos para citometria, acrescentou-se primeiramente 44µL de PBS/CaCl₂, em seguida 1µL de anexina V FITC e, por último, 5µL da amostra de MPs.

Após vórtex, os tubos foram deixados sob abrigo da luz por 15 minutos. Decorrido este período, foram acrescentados 200µL de PBS/CaCl₂. Os tubos foram mantidos em geladeira até o momento da aquisição.

Para aquisição aspirou-se todo o conteúdo do tubo, mantendo-se o fluxo fixo, para todas as amostras. A seleção da população anexina V foi obtida pela delimitação de um *gate*, conforme ilustrado na figura 1.

A contagem de MPs foi expressa em número de MPs/L de plasma.

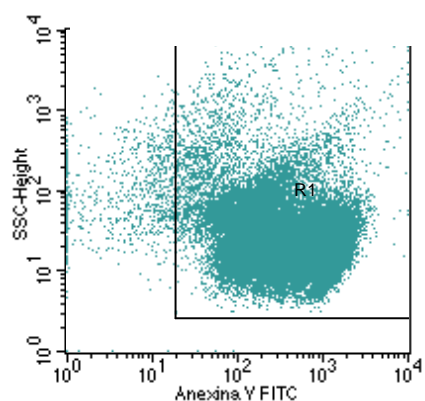


Figura 1- *Dot plot* obtido em citometria de fluxo, evidenciando o *gate* de delimitação para seleção da população anexina V positiva (R1).

Como se verificou a presença de elementos de tamanho que variavam desde aquele compatível com as MPs (menores que 10¹) até 10³, a contagem poderia estar incluindo células mortas, que por terem passado por processo de apoptose expressariam fosfatidilserina (reconhecida pela Anexina V) em sua membrana plasmática. Assim, a citometria de fluxo foi realizada em alguns indivíduos utilizando-se o Iodeto de Propídio (PI), que é um marcador monoclonal de células mortas, que se intercala no DNA (tabela 1).

Tabela 1- Esquema utilizado na preparação das amostras visando à identificação de células em meio às MPs, por citometria de fluxo.

	Tubo 1	
Anexina V FITC	1µL	FITC: Isitiocianato de fluoresceína
PI	3µL	PI: Iodeto de propídio
Amostra	5µL	PBS/CaCl₂: Tampão fosfato acrescido de cloreto de cálcio
PBS/CaCl₂	41µL	

4.2.2- Caracterização das MPs

Para caracterização das MPs as amostras foram preparadas utilizando-se um painel previamente descrito (Biro E. *et al* 2005; Biro, E. *et al* 2003; Berckmans, R.J. *et al* 2001), apresentado na tabela 2.

Tabela 2- Esquema utilizado na caracterização das MPs, para determinação da origem celular das MPs por citometria de fluxo.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
FITC	-	IgG 1: 1µL	CD235: 2µL	CD31: 2µL	Anti TF: 1µL
PE	-	IgG 1: 1µL	CD 61: 1µL	CD 14: 2µL	CD 61: 1µL
PerCP	-	-	CD 45: 5µL	CD 45: 5µL	CD 45: 5µL
APC	-	IgG 1: 1µL	Anexina V: 1µL	Anexina V: 1µL	Anexina V: 1µL
Amostra	5µl	5µL	5µL	5µL	5µL
PBS/CaCl₂	45µl	42µL	36µL	35µL	37µL

FITC: Isitiocianato de fluoresceína

PE: Ficoeritrina

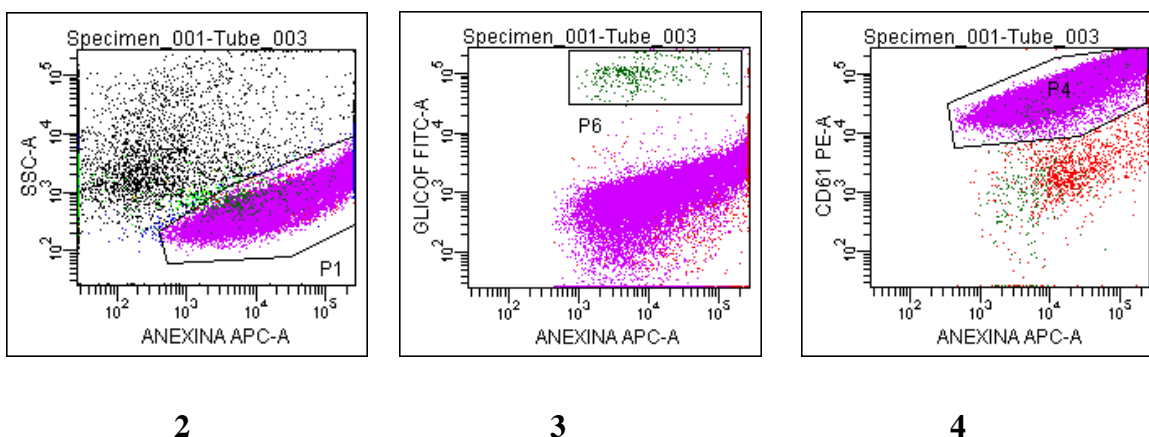
PerCP: Proteína Piridina de Clorofila

APC: Alofococianina

PBS/CaCl₂: Tampão fosfato acrescido de cloreto de cálcio

Em tubos específicos para citometria, acrescentou-se primeiramente o PBS/CaCl₂, em seguida o marcador e, por último, a amostra. Após vórtex, os tubos foram deixados sob abrigo da luz por 15 minutos. Decorrido este período, foram acrescentados 950µL de PBS/CaCl₂. Os tubos foram mantidos em geladeira até o momento da aquisição. Após aquisição de 10.000 eventos de cada tubo, para seleção da população anexina V positiva, foram adquiridos mais 20.000 eventos dentro desta população.

O número total de MPs foi definido tendo como base as características do *forward scatter/side scatter* e ligação com anexina V (Figura 4), sendo que as demais populações foram definidas a partir desta seleção (Figuras 2 a 4). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação a todos os eventos obtidos.



Figuras 2 a 4- *Dot plots* representativos obtidos em citometria de fluxo. Os *dot plots* foram *gateados* tendo como base características no *forward scatter/side scatter* e ligação à anexina V. **Fig. 2)** Plot SSC *versus* Anexina V: Eventos Anexina V positivos isolados do total de eventos contidos em P1. **Fig. 3)** MPs derivadas de eritrócitos, população duplo positiva para CD235 e Anexina V, contida em P6. **Fig. 4)** MPs derivadas de plaquetas, população duplo positiva para CD61 e Anexina V, contida em P4.

4.3- Fragmento 1+2 da protrombina

Para investigação se os pacientes ou controles apresentavam um aumento de geração de trombina no plasma, e nesta situação, se havia alguma relação com o número ou atividade procoagulante das MPs, um dos métodos utilizados foi a quantificação do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2). O F1+2 foi determinado por método imunoenzimático, utilizando-se o kit Enzygnost F1+2 micro® (Dade-Behring, Deerfield IL).

4.3.1- Plasma

Alíquotas de 250µL de plasma dos pacientes e controles foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Transferiu-se 50µL dos padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2 para uma placa de microtitulação recobertas com anticorpos de coelho contra o F1+2 humano, bem como 50µL do controle interno do kit ($1.00 \pm 0,20$ nmol/L) e, 50µL do plasma dos pacientes e seus respectivos controles. A placa foi incubada por 30 minutos (± 2 min) a 37°C e, após decorrido o tempo de incubação, foi lavada três vezes com solução tampão de fosfato 90mmol/L, contendo Tween 18g/L. Adicionou-se então 100µL de solução anti-F1+2 humana de coelho, conjugada com peroxidase e, novamente incubou-se a placa por 15 minutos (± 2 minutos) a 37°C. Lavou-se novamente a placa três vezes com solução tampão de fosfato 90mmol/L, contendo Tween 18g/L. Adicionou-se 100µL de solução do cromogênio dihidrocloridrato de o-fenilendiamina e incubou-se a mesma placa por 15 minutos (± 2 minutos) ao abrigo da luz. A reação foi então paralisada pela adição de 100µL de ácido sulfúrico 0,5N e, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, em até uma hora, em comprimento de onda 492nm.

Com a utilização dos padrões de F1+2 traçou-se uma curva de referência, com a concentração de F1+2 de 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L na abcissa, e a absorbância de 0 a 2 na ordenada.

Os resultados foram expressos em nmol/L.

4.3.2- Micropartículas

O *pellet* contendo 25µL da suspensão de MPs foi utilizado para o teste de fragmento 1+2 da protrombina.

Para analisar se as MPs apresentavam ação procoagulante, convertendo a protrombina em trombina, as mesmas foram incubadas com um *pool* de plasmas de 20 doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp. Em 4 tubos, cada um contendo 25µL de solução de MPs de um indivíduo saudável, acrescentou-se 50µL do *pool*, e os mesmos foram incubados por 5' (tubo 1), 10' (tubo 2), 20' (tubo 3) e 30' (tubo 4). Essa análise foi realizada para identificação do tempo com maior geração de trombina. Depois desse tempo de contato, transferiu-se a amostra para uma placa de microtitulação recoberta com anticorpos de coelho contra o F1+2 humano, 50µL de cada um dos quatro tubos, 50µL dos padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2, e 50µL do controle interno do kit (1.00 ± 0.20 nmol/L).

Como não houve diferença na geração de F1+2 nos diversos tempos analisados, elegeu-se o tempo de 10 minutos como o tempo de incubação entre o *pool* e as MPs provenientes de pacientes com TVP, SAF e FVL e seus controles pareados. O teste foi realizado conforme descrito anteriormente na padronização do tempo de incubação.

4.4- Dosagem de dímeros-D (DD2)

Este é um teste quantitativo automatizado que permite a determinação imunoenzimática dos produtos de degradação da fibrina em plasma humano citratado, pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), utilizando-se o kit VIDAS® D-Dimer exclusion (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Os DD2 são resultantes apenas da ação da plasmina sobre a fibrina, portanto, refletem a fibrinólise secundária.

O princípio deste teste associa o método imunoenzimático por *sandwich* em 2 etapas, com uma detecção final em fluorescência. Na primeira etapa, a amostra é transferida para o poço que contém um anticorpo monoclonal contra o produto de

degradação da fibrina, marcado com fosfatase alcalina. Esta etapa permite ao antígeno ligar-se, por um lado, às imunoglobulinas fixadas e, por outro, ao conjugado, formando assim um *sandwich*. Numa segunda etapa, dá-se a saturação dos antígenos que ficaram livres. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados. Em seguida são efetuadas duas etapas de revelação sucessivas. Em cada etapa, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato é aspirado e dispensado; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a 450nm. A fluorescência gerada é proporcional à concentração do antígeno presente na amostra. Os resultados são calculados automaticamente pelo sistema em relação à curva de calibração, padronizada previamente pela dosagem do DD2 em 50 indivíduos normais.

Primeiramente, adaptou-se ao aparelho um barrete e um cone para cada amostra, controle ou calibrador. Os calibradores e controles foram identificados no aparelho e testados em duplicata. Os calibradores, controles e amostras foram homogeneizados por vórtex e depois 200µL de seu conteúdo foi transferido para o poço do barrete. Daí em diante o aparelho prosseguiu a análise.

A análise foi realizada em amostras, independente do número de MPs, ou após correção do número de MPs.

Os resultados foram expressos em ng/mL.

4.4.1- DD2 com o número total de MPs

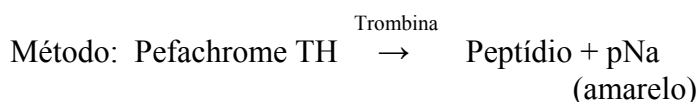
Acrescentou-se em tubos plásticos em banho-maria, 200µL de um *pool* de plasmas de 20 indivíduos saudáveis e 25µL do *pellet* de MPs. As amostras foram homogeneizadas e, em seguida, acrescentou-se 25µL de CaCl₂ 0,1mol/L e, acionou-se o cronômetro. Após dois minutos, 200µL desta solução foi transferida para o poço com o barrete e, procedeu-se o teste normalmente.

4.4.2- DD2 com a correção do número de MPs

O número de MPs foi acertado para 10.000 com a adição de PBS, conforme a contagem inicial de MPs. Acrescentou-se 200µL de um *pool* de plasma de 20 indivíduos saudáveis e 25µL do *pellet* de MPs corrigidas, em tubos plásticos em banho-maria. As amostras foram homogeneizadas e, em seguida, acrescentou-se 25µL de CaCl₂ 0,1mol/L e, acionou-se o cronômetro. Após dois minutos, 200µL desta solução foi transferida para o poço com o barrete e, procedeu-se o teste normalmente.

4.5- Teste de Geração de Trombina (TGT)

O TGT é um teste funcional cromogênico, que permite medir a capacidade de geração de trombina. MPs isoladas são reconstituídas em um *pool* de plasma desfibrinado e livre de MPs, a 37°C. A coagulação é iniciada pela adição de CaCl₂. Em intervalos fixos de 30 segundos, alíquotas são removidas da mistura e adicionadas ao substrato cromogênico S-2238 (Pefachrome TH[®] - Chromogenix AB, Molndal, Suécia). Depois de 5 minutos a conversão deste substrato cromogênico é paralisada pela adição de ácido cítrico.



É utilizada uma placa para o preparo da reação (contendo o *pool* de plasma desfibrinado + BSA/Tampão A + controles internos da reação: tromboplastina (Tromborel[®]) como controle positivo da via extrínseca da coagulação ou caulin + fosfolípidos como controle positivo da via intrínseca, além das amostras de MPs de pacientes e controles. Outras placas são destinadas à revelação da reação, contendo o substrato cromogênico S-2238 + BSA/Tampão B.

Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva formada pelas densidades ópticas obtidas.

4.5.1- Preparação de *pool* defibrinado de plasma de voluntários saudáveis

Foram colhidos 5mL de sangue em tubos contendo citrato de sódio 3,8% de 20 voluntários oriundos do Centro de Captação de Doadores de Sangue do Hemocentro da Unicamp. O processamento da amostra foi imediato, e sangue foi centrifugado a 3.000g por 15 minutos e o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi então separado. O mesmo volume de PPP de cada indivíduo foi utilizado para a preparação do *pool*. Os PPPs foram misturados e após vórtex por 30 segundos acrescentou-se 20µL de Reptilase® (Diagnostica Stago, Asnieres, França) para cada 1000µL de *pool*. O *pool* foi incubado a 37°C em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, colocado em gelo por 10 minutos. O coágulo de fibrina foi removido por centrifugação a 3.000g por 10 minutos. O *pool* foi então aliquotado e armazenado a -80°C.

4.5.2- Preparação da reação

Montou-se a placa com uma coluna para cada item a ser analisado na reação: branco, tromboplastina, caulin + fosfolipídeos e MPs de pacientes e controles.

Usou-se A1 para branco, A2 para tromboplastina (Thromborel S®, Dade Behring, Newark, USA: reconstituição de acordo com o fabricante e posterior diluição de 50 vezes), A3 para caulin 0,01mg/mL + fosfolipídeos (fosfatidilserina e fosfatidilcolina, ambas a 0,001mg/mL). As colunas seguintes foram destinadas ao estudo das MPs. Para cada paciente realizou-se esta análise de duas maneiras: uma com o número de MPs corrigido para 10.000 (C) e outra sem a correção do número de MPs (S). A correção do número de MPs para 10.000 foi feita diluindo-se as MPs em PBS. Assim, A4 foi destinada ao paciente 1 C, A5 para o paciente 1 S, A6 para paciente 2 C, A7 para paciente 2 S, A8 para paciente 3 C e A9 para paciente 3 S.

Foi confeccionado um *pool* dos controles pareados aos pacientes estudados na reação. Estes indivíduos foram agrupados de acordo com sua contagem de MPs e o seu estudo foi realizado também de duas maneiras: uma com o número de MPs corrigido para 10.000 (A10) e outra, sem a correção do número de MPs (A11). Adicionou-se 15µL de

BSA/Tampão A (BSA 0,05% em tris-HCl 0,05mol/L e NaCl 0,1mol/L em água destilada pH 7.35) no poço destinado ao branco (A1) e 5µL de BSA/Tampão A no poço destinado à tromboplastina (A2) e, aos destinados às MPs de pacientes e controles (A4 a A11). Adicionou-se 10µL de solução de tromboplastina em A2, 10µL de solução de caulin + 10µL de solução de fosfolipídeos em A3 e, 10µL de MPs à cada poço destinado ao estudo dos pacientes/controles. Adicionou-se 120µL de *pool* de plasma desfibrinado nos poços da linha B de cada coluna. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Decorrido este tempo, transferiu-se 120µL do *pool* contido na linha B para a linha A. Adicionou-se na mesma placa 60µL de CaCl₂ 0,1mol/L na linha D, seguindo-se uma incubação por 10 minutos a 37°C.

4.5.3- Preparação das placas destinadas à revelação da reação

A solução estoque (2,5mg/mL) de substrato cromogênico S-2238 foi dissolvida em BSA/Tampão B (BSA 0,05% tris-HCl 0,05mol/L, NaCl 0,1mol/L e EDTA 20mmol/L em água destilada pH 7.9). Para esta diluição, acrescentou-se 284µL de substrato cromogênico em 5mL de BSA/Tampão B. Esta quantidade foi multiplicada pelo número de colunas incluídas.

Em placas separadas destinadas à revelação da reação, colocou-se 147µL do substrato cromogênico/BSA/Tampão B. As placas foram incubadas a 37°C por 10 minutos antes da realização do teste.

4.5.4- Reação

A geração de trombina é iniciada com a transferência de 30µL do CaCl₂ da linha D para a linha A, utilizando-se pipeta multicanal. O cronômetro foi acionado no momento da adição do CaCl₂. Por 15 intervalos de 1 minuto foram removidos 3µL desta

mistura, utilizando-se uma pipeta multicanal, que foram adicionados aos 147 μ L de substrato cromogênico, linha por linha. A reação foi bloqueada após 5 minutos pela adição de 90 μ L de ácido cítrico 1mol/L. Foi realizada uma curva padrão de trombina humana, com concentrações finais que variavam de 0,75U de trombina até 0,012U. A curva foi feita nas mesmas condições que a reação, ou seja, foram acrescentados 3 μ L de solução de trombina, esta ficou em contato com o cromógeno por 5 minutos e, decorrido este tempo, a reação foi neutralizada com ácido cítrico. A densidade óptica das placas de revelação e da curva foram lidas no comprimento de onda 405nm.

Para padronização da reação vários testes foram realizados, para determinar qual condição seria mais adequada e sensível para a detecção da geração de trombina pelas MPs, conforme descrito a seguir:

- a)-Dosagem de fibrinogênio no *pool* de plasma desfibrinado, para garantir ausência de fibrinogênio;
- b)-Realização de Tempo de Protrombina (TP) em amostra de plasma de um indivíduo normal utilizando-se a tromboplastina de uso na reação, para certificação de que a atividade do mesmo estava adequada;
- c)-Realização do Tempo de Coagulação com Caulin (TCK) em amostra de plasma de um indivíduo normal, utilizando-se o caulin de uso na reação, para indicar que o mesmo apresentava atividade adequada;
- d)-Realização do Tempo Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) em amostra de plasma de um indivíduo saudável, utilizando-se o CaCl₂ de uso no TGT, para comprovar que o mesmo estava em perfeito funcionamento.
- f)-Inclusão de controle com provável aumento de MPs - como já é bem estabelecido que algumas patologias levam a um aumento importante do número de MPs, com grande geração de trombina quando avaliado pelo TGT, também foram incluídas amostras de MPs de 2 pacientes com diagnóstico de Linfoma não-Hodgkin em atividade.

- g)-Teste com o S-2238 – foram realizados testes com várias concentrações de S-2238, isto é, concentração usual, concentração em dobro e quatro vezes maior, combinado com a tromboplastina de uso e também quadruplicada.
- h)-Leitura da placa em vários comprimentos de onda, isto é, 340nm, 390nm e 405nm (comprimento de onda utilizado para a leitura do teste);
- i)-Teste com outro lote de S-2238.

4.6- Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa software GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Para a confecção dos gráficos utilizou-se os programas GraphPad Prisma 5.00. (GraphPad Software, San Diego, USA) e o SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Para a análise estatística foi empregado o teste U de Mann-Whitney e ANOVA, sendo aplicado o test *post hoc* de Kruskal-Wallis para valores de P inferiores a 0,05.

O resultado da análise estatística foi considerado estatisticamente significativo com um valor de $P < 0,05$.

5- RESULTADOS

5.1- Características clínicas

Foram incluídos 9 pacientes com TVP ao diagnóstico (5 mulheres/4 homens), 10 pacientes com TVP após 6 meses do evento trombótico (7 mulheres/3 homens), 11 pacientes com SAF/TVP (9 mulheres/2 homens) e 7 indivíduos assintomáticos carreadores do FVL (7 mulheres), além dos controles pareados.

As tabelas 3 e 4 descrevem os dados relativos à idade média, sexo e etnia dos pacientes e grupos controles pareados.

Tabela 3- Média e desvio-padrão (DP) das idades dos pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses do evento trombótico, SAF/TVP, indivíduos com FVL e seus respectivos controles pareados.

	Pacientes		Controles		P
	Média Idade	DP	Média Idade	DP	
TVP ao diagnóstico (n=9)	41,11	15,97	40,33	16,06	0,13
TVP 6 meses (n=10)	32,90	9,61	32,90	9,55	0,99
SAF/TVP (n=11)	33,82	8,28	34,00	8,11	0,82
FVL (n=7)	34,00	8,39	33,71	9,30	0,69

Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 4- Classificação dos indivíduos em relação ao sexo e etnia de acordo com o grupo de estudo: pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses do evento trombótico, SAF/TVP, indivíduos com FVL. Os controles têm a mesma distribuição por serem pareados por esses parâmetros

	Caucasóide (%)	Afro-descendente (%)
TVP ao diagnóstico (n=9)	77,78	22,22
TVP 6 meses (n=10)	50,00	50,00
SAF/TVP (n=11)	63,64	36,36
FVL (n=7)	100,00	-

5.2- Citometria de fluxo

5.2.1- Pre-análise da quantificação e caracterização das MPs

Antes da enumeração e caracterização das MPs, realizou-se uma análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo, utilizando-se o anticorpo anexina V. Os eventos estudados possuíam características compatíveis as MPs, ou seja, tamanho reduzido e positividade para anexina V, o que pode ser observado na figura 5.

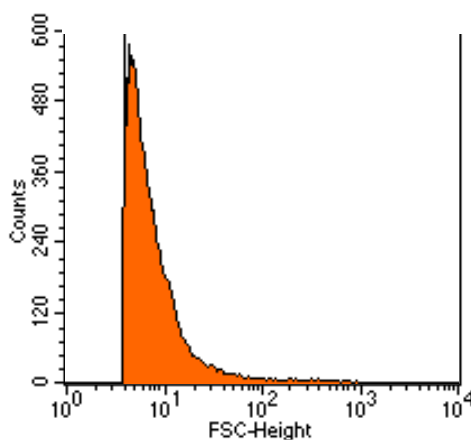


Figura 5- *Dot plot* da análise obtida por citometria de fluxo com anexina V, em que se observa que a população selecionada possui tamanho reduzido, compatível ao tamanho das MPs.

Também para descartar que durante a quantificação das MPs células apoptóticas tivessem sido incluídas erroneamente na contagem, foram realizados experimentos utilizando-se o PI (Iodeto de Propídeo). Os resultados demonstraram que não havia a presença tanto de células mortas como apoptóticas no material analisado, conforme demonstrado na figura 6.

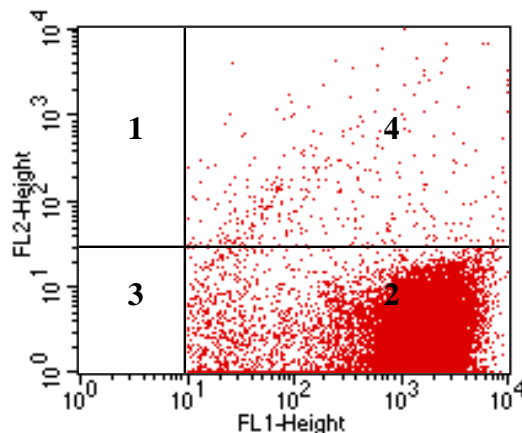


Figura 6- Dot plot da análise obtida por citometria de fluxo, no qual se observa apenas uma população, sendo ela positiva para anexina V e negativa para PI (quadrante 2).

5.2.2- Quantificação de MPs

As MPs foram quantificadas através da citometria de fluxo, utilizando-se o anticorpo monoclonal anexina V. A tabela 5 mostra o número de MPs por litro de plasma, além de seus valores mínimos e máximos. A comparação entre os grupos não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 5- Resultados das medianas (mínimo-máximo) do número de MPs/L de plasma em pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses de tratamento, SAF/TVP e indivíduos com FVL.

	MPs/L de plasma ($\times 10^6$)		
	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses	379,0	247,8	0,18
(n= 9)	(140,8-726,8)	(32,8-676,7)	
TVP ao diagnóstico	158,6	248,0	0,28
(n= 09)	(97,3-380,5)	(148,8-535,1)	
SAF/TVP	290,2	172,7	0,10
(n= 10)	(134,3-479,6)	(39,7-369,2)	
FVL	333,6	227,3	0,53
(n= 07)	(26,3-665,2)	(122,9-373,1)	

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

A comparação entre o número de MPs nos subgrupos de pacientes com TVP ou no grupo total de pacientes com TVP (TVP há 6 meses + TVP ao diagnóstico + TVP com SAF) com o grupo total dos controles (CTR total) não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa (tabela 6).

Tabela 6- Comparações entre o número de MPs/L de plasma no grupo total de pacientes com TVP (TVP 6 meses + TVP diagnóstico + SAF/TVP), ou nos subgrupos de TVP, com o grupo controle total (CTR total).

MPs/L de plasma ($\times 10^6$)									
	CTR	TVP	P	TVP	P	TVP	P	SAF/	P
	Total	Total		6 meses		diagnóstico		TVP	
	(n=29)	(n=22)		(n=10)		(n=9)		(n=11)	
Mediana	264,0	186,85	0,55	379,0	0,11	158,5	0,90	290,2	0,19
Mínimo	32,8	97,3		140,8		97,3		134,3	
Máximo	676,7	402,7		726,8		380,5		479,6	
Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.									

O número de MPs de pacientes com TVP há 6 meses também foi comparado com o número de MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico e o de pacientes com SAF/TVP; e também o número de MPs dos pacientes com TVPhá 6 meses somados aos pacientes com SAF/TVP foi comparado com o número dos seus controles pareados também somados e não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma destas análises.

5.2.3- Caracterização de MPs

As MPs foram caracterizadas através da citometria de fluxo, com o emprego de anticorpos monoclonais específicos.

O total de MPs (eventos positivos com o anticorpo anexina V) foi calculado em relação ao número total de eventos e os resultados foram expressos em porcentagem. Os resultados mostraram um aumento estatisticamente significativo entre os valores obtidos nos pacientes com SAF/TVP em relação a seus respectivos controles, conforme demonstrado na tabela 7 e figura 7.

Tabela 7- Comparação entre a porcentagem de MPs (eventos anexina V positivos) e seus valores mínimos e máximos, em pacientes e controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	40,8% (10,8-65,7)	32,3% (20,2-56,5)	0,36
TVP ao diagnóstico (n=9)	56,5% (22,2-84,0)	63,6% (12,1-83,4)	0,73
SAF/TVP (n=10)	44,5% (12,4-80,8)	17,8% (0,9-47,1)	0,008
FVL (n=7)	48,6% (2,8-81,8)	29,6 % (2,6-63,0)	0,62

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

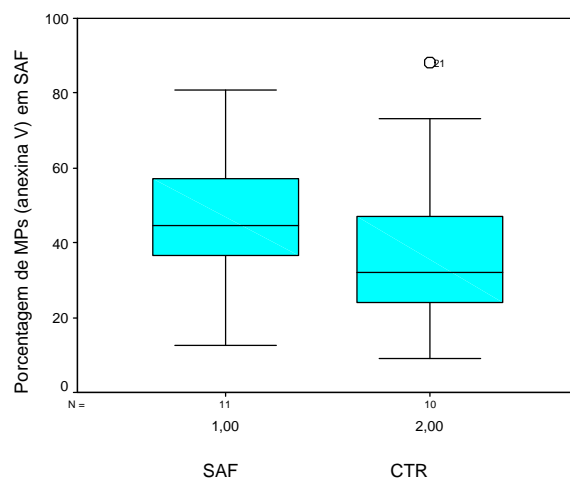


Figura 7- Representação gráfica das porcentagens de MPs (eventos positivos para anexina V) em pacientes com SAF comparados com seus respectivos controles pareados (P=0,008).

A comparação entre as porcentagens de MPs (eventos anexina V positivos) dos pacientes com TVP ao diagnóstico, TVP após 6 meses do evento trombótico, SAF/TVP (SAF) e FVL foram comparadas entre si, e mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,50$). Também foi feita a comparação das porcentagens dos pacientes com o grupo de todos os indivíduos saudáveis incluídos (CTR total) (tabela 8). Esta análise não mostrou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados.

Tabela 8- Comparação entre a porcentagem de MPs (eventos anexina V positivos) e seus valores mínimos e máximos, em pacientes e grupo controle total (CTR total)

	Pacientes	CTR total (n=37)	P
TVP 6 meses (n=10)	40,5% (10,8-65,7)	32,1% (0,9-83,4)	0,52
TVP ao diagnóstico (n=9)	56,5% (22,2-84,0)		0,12
SAF/TVP (n=11)	44,5% (12,4-80,8)		0,27
FVL (n=7)	48,6% (12,8-81,8)		0,80

As MPs foram caracterizadas utilizando-se anticorpos monoclonais que identificam as séries eritrocítica (CD 235: tabela 9), plaquetária (CD61: tabela 10), monocítica (CD14: tabela 11), endotelial (CD31: tabela 12), leucocitária (CD45: tabela 13) e as MPs que expressam Fator Tecidual (Anti-TF: tabela 14).

Tabela 9- Comparação entre as porcentagens de MPs de origem eritrocítica (eventos duplo positivos para CD235 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=9)	1,4% (0,2-3,9)	1,2% (0,6-2,6)	0,99
TVP ao diagnóstico (n=7)	1,0% (0,2-2,8)	1,2% (0,3-2,4)	0,79
SAF/TVP (n=10)	1,9% (0,6-4,5)	5,3% (0,3-16,9)	0,09
FVL (n=7)	1,5% (0,9-22,0)	2,4% (1,3-17,6)	0,62

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

A comparação entre as porcentagens de MPs de origem eritrocítica não mostrou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados. Na comparação da porcentagem destas MPs entre os grupos não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa (P= 0,63).

A análise estatística revelou um aumento estatisticamente significativo da porcentagem de MPs de origem plaquetária nos pacientes com SAF/TVP (P=0,01), em relação ao seu grupo controle, o que também pode ser observado na tabela 10 e figura 8.

Tabela 10- Comparação entre as porcentagens de MPs de origem plaquetária (eventos duplo positivos para CD61 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	96,4% (83,0-98,3)	96,6% (92,7-97,0)	0,96
TVP ao diagnóstico (n=9)	89,9% (86,2-97,6)	95,0% (93,6-95,8)	0,16
SAF/TVP (n=11)	93,7% (88,4-97,2)	88,2% (70,3-93,5)	0,01
FVL (n=7)	92,2% (75,4-96,3)	92,2% (77,7-97,2)	0,94

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

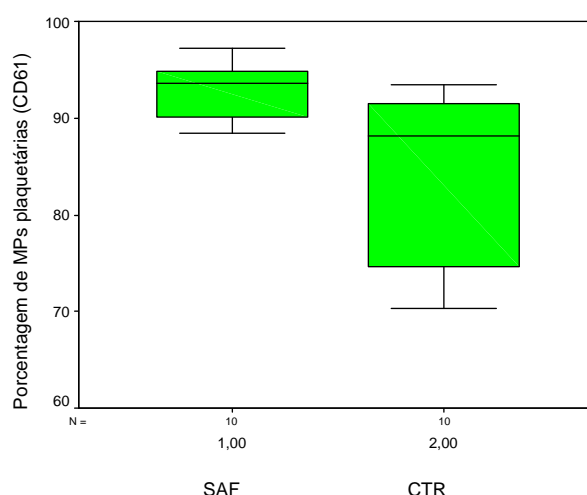


Figura 8- Representação gráfica das porcentagens de MPs de origem plaquetária (eventos duplo positivos para CD61 e anexina V) em pacientes com SAF comparados com seus respectivos controles pareados (P=0,01).

A análise das porcentagens de MPs de origem plaquetária de pacientes com TVP a 6 meses não foi estatisticamente diferente quando comparada à porcentagem de pacientes com TVP ao diagnóstico. Também não houve diferença estatística quando somaram-se as porcentagens dos pacientes com TVP às dos pacientes com SAF/TVP comparados com seus respectivos controles pareados. Na comparação da porcentagem destas MPs mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes com TVP a 6 meses e pacientes e TVP ao diagnóstico ($P=0,04$), TVP 6 meses e SAF ($P=0,02$), e FVL e TVP a 6 meses ($P=0,04$). Já a comparação entre pacientes com TVP ao diagnóstico e SAF, FVL e TVP ao diagnóstico e FVL e SAF não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

A análise estatística não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa na comparação entre as porcentagens de MPs de origem monocítica entre os pacientes e seus grupos controle (Tabela 11).

Tabela 11- Comparação entre as porcentagens de MPs de origem monocítica (eventos duplo positivos para CD14 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	0% (0-0,1)	0% (0-0,1)	0,99
TVP ao diagnóstico (n=9)	0%	0%	*
SAF/TVP (n=11)	0% (0-0,1)	0%	*
FVL (n=7)	0% (0-0,4)	0% (0-0,1)	0,59

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste de Wilcoxon. * Não foi possível o cálculo do P nos grupos dos indivíduos com TVP ao diagnóstico, pois todos os pacientes e controles apresentaram porcentagem de MPs expressando CD14 igual a zero. O mesmo aconteceu no grupo de indivíduos com SAF, pois todos os controles apresentaram porcentagem de MPs expressando CD14 igual a zero.

A análise estatística mostrou uma diminuição estatisticamente significativa de MPs de origem endotelial em pacientes com TVP ao diagnóstico ($p=0,03$), quando comparados aos seus controles (tabela 12 e figura 9).

Tabela 12- Comparação entre as porcentagens de MPs de origem endotelial (eventos duplo positivos para CD31 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=9)	0,1% (0-0,1)	0 (0-0,2)	0,73
TVP ao diagnóstico (n=9)	0% (0-0,4)	0,4% (0-1,8)	0,03
SAF/TVP (n=10)	0% (0-0,1)	0,05% (0-0,3)	0,23
FVL (n=7)	0% (0-0,2)	0,05% (0-0,3)	0,77

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

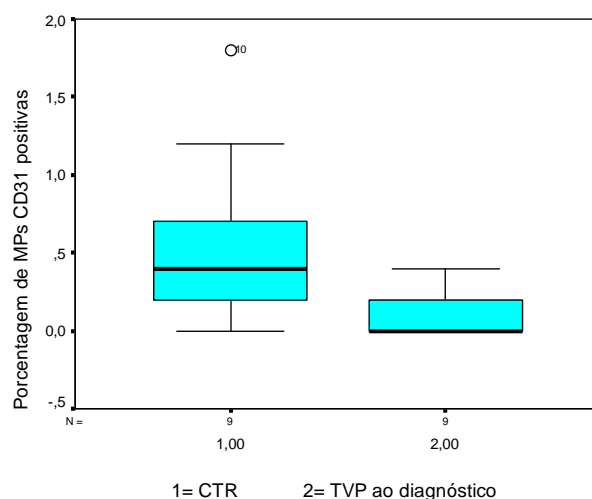


Figura 9- Representação gráfica das porcentagens de MPs de origem endotelial (eventos duplo positivos para CD31 e anexina V) em pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com seus respectivos controles pareados ($P=0,03$).

A análise estatística não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa na comparação entre as porcentagem de MPs de origem leucocitária entre os pacientes e seus grupos controle (Tabela 13).

Tabela 13- Comparação entre as porcentagens de MPs de origem leucocitária (eventos duplo positivos para CD45 e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	0%	0% (0-0,1)	*
TVP ao diag. (n=8)	0% (0-0,1)	0% (0-0,2)	0,30
SAF/TVP (n=9)	0,03% (0-0,06)	0,03% (0-3,4)	0,42
FVL (n=6)	0% (0-0,6)	0% (0-0,2)	0,83

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney. * Não foi possível o cálculo do P no grupo dos indivíduos com TVP a 6 meses, pois todos os pacientes apresentaram porcentagem de MPs expressando CD45 igual a zero.

A análise estatística não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa na comparação entre as porcentagem de MPs com expressão de Fator Tecidual entre os pacientes e seu grupo controle (Tabela 14).

Tabela 14- Comparação entre as porcentagens de MPs que expressam Fator Tecidual (eventos duplo positivos para anti-TF e anexina V), entre subgrupos de pacientes e seus respectivos controles.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	0% (0-0,3)	0% (0-0,5)	0,63
TVP ao diag. (n=9)	0% (0-0,7)	0% (0-0,7)	0,63
SAF/TVP (n=11)	0% (0-0,3)	0,1% (0-0,9)	0,43
FVL (n=7)	0%	0,06% (0-0,2)	*

Mediana (mínimo-máximo). * Não foi possível o cálculo do P no grupo dos indivíduos com FVL, pois todos os indivíduos apresentaram porcentagem de MPs expressando Fator Tecidual igual a zero.

5.3- Fragmento 1+2 de protrombina

5.3.1- Plasma

A curva padrão foi realizada utilizando-se os padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de fragmento 1+2 de protrombina, e os resultados foram plotados em escala *log-log* (figura 10).

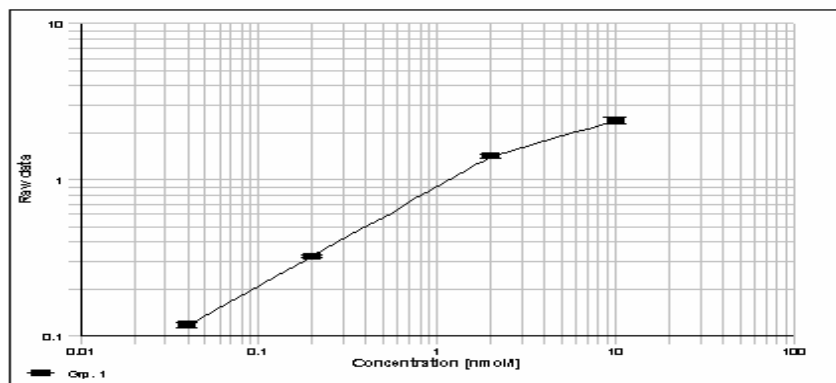


Figura 10- Curva utilizando-se os padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2.

A comparação entre as dosagens do F1+2 no plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico, SAF/TVP, FVL e, seus controles pareados mostrou que houve uma diminuição estatisticamente significativa apenas no grupo de pacientes com SAF/TVP ($p=0,004$). Nos demais grupos não houve diferença significativa entre os pacientes e seus controles ($P=0,92$ e $P=0,74$ para os grupos TVP após 6 meses do diagnóstico e FVL, respectivamente) (figura 11).

Tabela 15- Comparação entre a dosagem de F 1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP 6 meses), SAF/TVP e FVL comparados com seus controles pareados. Os resultados foram expressos em nmol/L.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	0,36 (0,08-0,52)	0,34 (0,18-0,72)	0,74
SAF/TVP (n=10)	0,08 (0,05-0,62)	0,35 (0,21-0,62)	0,004
FVL (n=5)	0,39 (0,35-0,84)	0,42 (0,25-0,55)	0,92

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

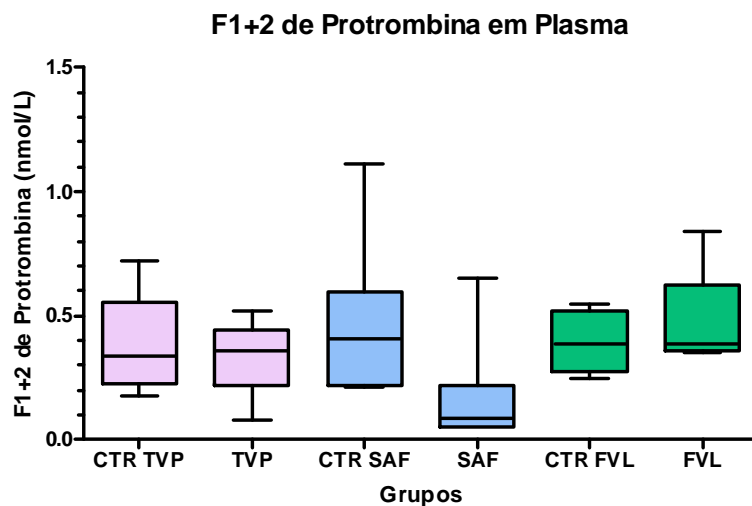


Figura 11- Dosagens de F1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP), SAF/TVP (SAF), FVL e, seus controles pareados (CTR). Os resultados foram expressos em nmol/L.

A comparação entre as dosagens de F1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico, SAF/TVP e FVL com as dosagens de F1+2 de todos os indivíduos saudáveis (CTR total) mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no grupo dos pacientes com SAF/TVP ($P=0,002$), conforme apresentado na tabela 15 e figura 12.

Tabela 16- Dosagens de F 1+2 em plasma de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP 6 meses), SAF/TVP e FVL comparados com grupo de indivíduos controles total (CTR total). Os resultados foram expressos em nmol/L.

	Pacientes	CTR Total (n=26)	P
TVP 6 meses (n=10)	0,35 (0,08-0,52)	0,37 (0,18-1,11)	0,38
SAF/TVP (n=11)	0,09 (0,05-0,65)		0,002
FVL (n=5)	0,39 (0,35-0,84)		0,48

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

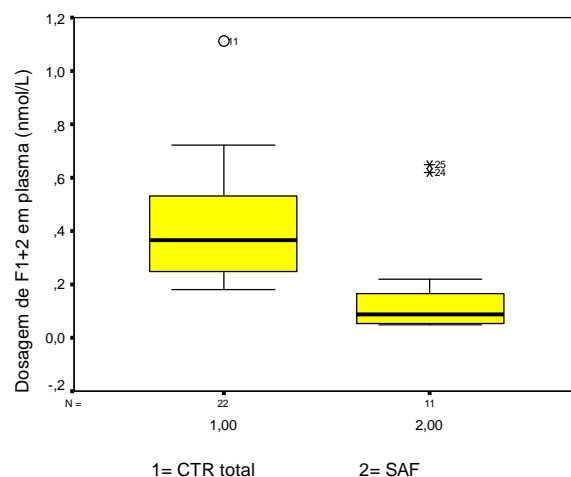


Figura 12- Dosagem do fragmento 1+2 de protrombina (F1+2) em plasma de pacientes com SAF/TVP comparados com o grupo de controles total (CTR total) (P=0,002).

5.3.2- Micropartículas

A curva padrão foi realizada utilizando-se os padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2 e os resultados foram plotados em escala *log-log* (figura 13).

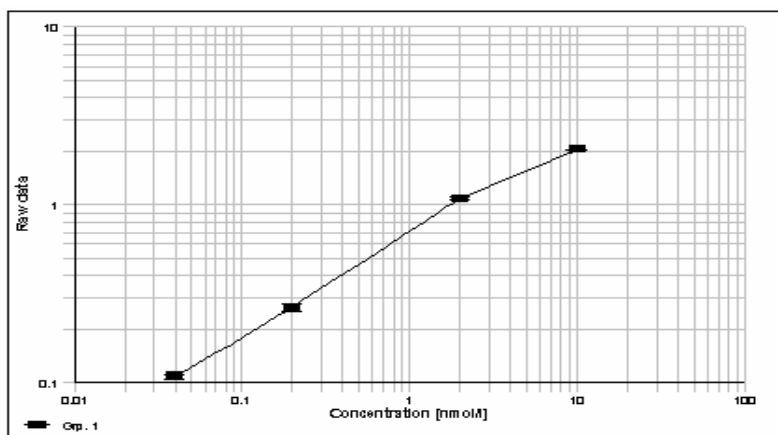


Figura 13- Curva utilizando-se os padrões 0.04, 0.2, 2.0 e 10 nmol/L de F1+2.

Como pode ser observado, os resultados do F1+2 utilizados na realização da curva padrão tanto com o plasma como com as MPs foi semelhante.

A comparação entre as dosagens do F1+2 em *pool* de plasmas de doadores após incubação com MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico, SAF/TVP, FVL e de seus controles pareados mostrou uma diminuição significativa no grupo de pacientes com SAF/TVP ($P=0,0001$). Nos demais grupos não houve diferença significativa ($P= 0,24$ e $P=0,11$ para os grupos TVP após 6 meses do diagnóstico e FVL, respectivamente) (figura 14).

Tabela 17: Dosagens de F 1+2 em *pool* de plasmas incubados com MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP 6 meses), SAF/TVP e FVL comparados com grupo de controles pareados. Os resultados foram expressos em nmol/L.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=9)	0,35 (0,32-0,46)	0,38 (0,33-0,55)	0,24
SAF/TVP (n=7)	0,31 (0,26-0,34)	0,45 (0,36-0,52)	0,0001
FVL (n=4)	0,29 (0,28-0,40)	0,36 (0,31-0,55)	0,11

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

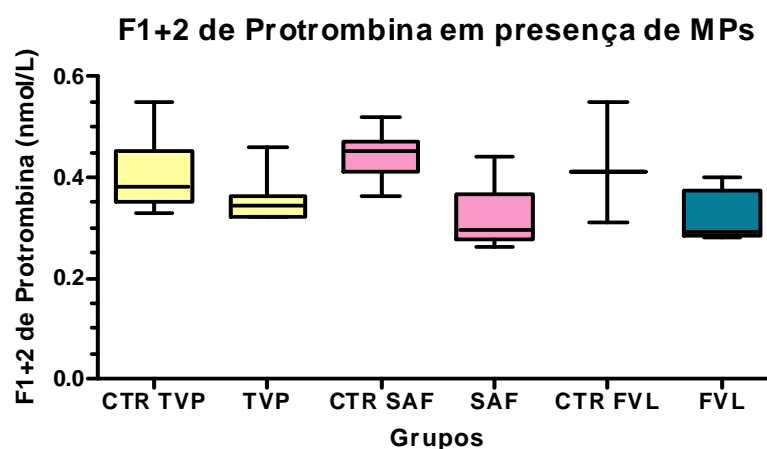


Figura 14- Dosagem do F1+2 em *pool* de plasma de doadores de sangue incubados por 10 minutos com MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico (TVP), SAF/TVP (SAF), FVL e, seus controles pareados (CTR). Os resultados foram expressos em nmol/L.

A comparação entre as dosagens de F1+2 em pool de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico, SAF/TVP (SAF) e FVL, e as dosagens de F1+2 de todos os indivíduos saudáveis (CTR total) (tabela 16), mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no grupo dos pacientes com SAF/TVP e FVL ($P=0,008$ e $P=0,009$; figuras 15 e 16, respectivamente).

Tabela 18- Dosagens de F1+2 em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com TVP após 6 meses do diagnóstico, SAF/TVP e FVL comparadas àquela do grupo de indivíduos controles total (CTR total). Os resultados foram expressos em nmol/L.

	Pacientes	CTR Total (n=17)	P
TVP 6 meses (n=9)	0,35 (0,32-0,46)	0,41 (0,31-0,55)	0,07
SAF/TVP (n=6)	0,30 (0,26-0,44)		0,008
FVL (n=4)	0,29 (0,28-0,40)		0,009

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

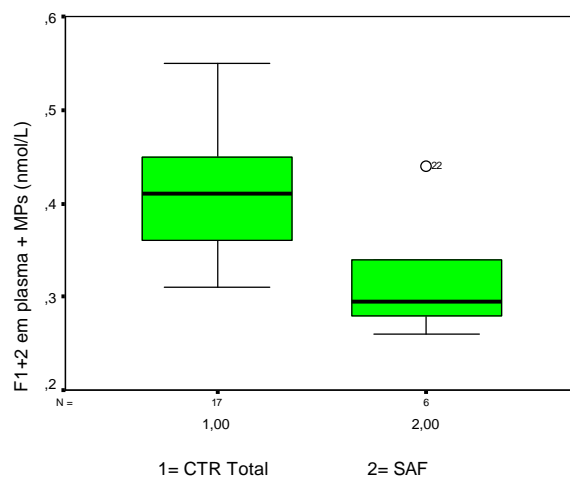


Figura 15- Representação gráfica das dosagens de F 1+2 em *pool* de plasma de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com SAF/TVP comparados com grupo de indivíduos controles total (CTR total) ($P=0,008$).

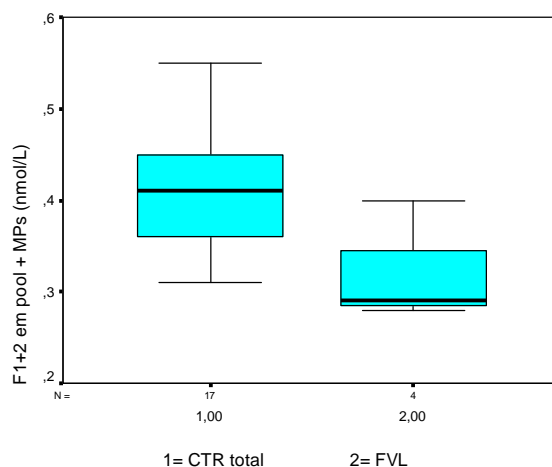


Figura 16- Representação gráfica das dosagens de F 1+2 em *pool* de plasma de indivíduos saudáveis em presença de MPs de pacientes com FVL comparados com grupo de indivíduos controles total (CTR total) (P=0,009).

5.4- Dosagem de D-dímero

A dosagem de DD2 foi uma das técnicas empregadas para análise da atividade procoagulante das MPs. A comparação entre as dosagens de DD2 em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de 25µL de MPs nos diversos subgrupos de pacientes com TVP e seus respectivos controles mostrou um aumento estatisticamente significativo entre os pacientes com TVP ao diagnóstico (tabela 17 e figura 17) (P=0,001).

Tabela 19- Dosagens de DD2 em *pool* de plasma de indivíduos saudáveis em presença de 25µL de MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e seus respectivos controles. Os resultados foram expressos em ng/mL.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	184,0 (156,0-212,7)	179,7 (160,1-212,5)	0,80
TVP ao diagnóstico (n=9)	226,0 (190,1-379,0)	193,3 (164,6-210,6)	0,001
SAF/TVP (n=5)	161,1 (143,8-181,9)	151,9 (143,6-563,7)	0,99

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

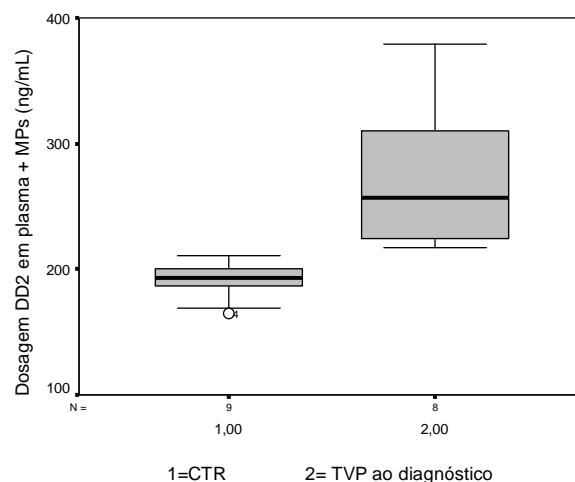


Figura 17- Representação gráfica da dosagem de D-dímero (DD2) em *pool* de indivíduos saudáveis em presença de 25μL de MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com seus controles pareados (CTR) (P= 0,001).

Na comparação das dosagens de DD2 em presença de 25μL de MPs entre os grupos de pacientes foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com TVP a 6 meses e TVP ao diagnóstico (P<0,01) e TVP ao diagnóstico e TVP/SAF (P< 0,001).

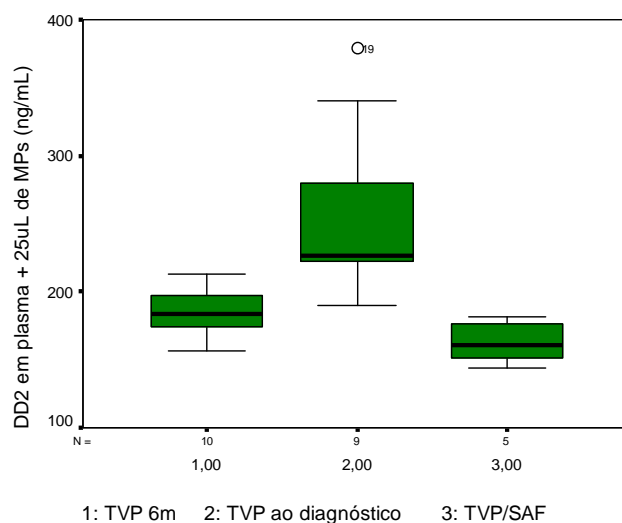


Figura 18- Dosagem de D-dímero (DD2) em *pool* de indivíduos saudáveis em presença de 25μL de MPs de pacientes com TVP há 6 meses (box1), TVP ao diagnóstico (box 2) e TVP/SAF (box 3).

Observou-se também um aumento estatisticamente significativo no grupo de pacientes com TVP ao diagnóstico ($P=0,0001$), quando compararam-se as dosagens de DD2 em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis com 25 μ L de MPs dos 3 subgrupos de TVP com o grupo controle total (tabela 18 e figura 18). Apesar de não ter apresentado uma diferença significativa, o grupo SAF mostrou valores diminuídos quando comparados ao grupo controle total ($P=0,06$).

Tabela 20- Dosagens de DD2 em *pool* de plasma de indivíduos saudáveis em presença de 25 μ L de MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e grupo controle total. Os resultados foram expressos em ng/mL.

	Pacientes	CTR Total (n=24)	P
TVP 6 meses (n=6)	184,1 (156,0-212,7)	184,7 (143,6-563,7)	0,93
TVP ao diagnóstico (n=9)	226,0 (190,1-379,0)		0,0001
SAF (n=6)	161,1 (143,8-181,9)		0,06

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

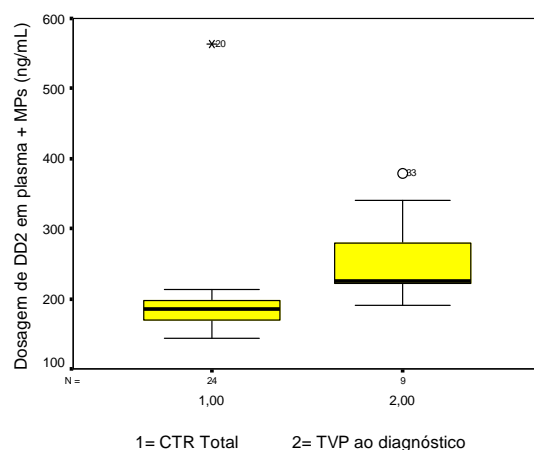


Figura 19- Representação gráfica da dosagem de D-dímero (DD2) em *pool* de indivíduos saudáveis em presença de 25 μ L MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico comparados com o grupo de controles total (CTR total) ($P= 0,0001$).

Na análise entre as dosagens de DD2 em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de 25µL MPs de pacientes não mostrou diferença quando comparou-se os grupos TVP após 6 meses e TVP ao diagnóstico; TVP 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e nem TVP 6 meses + SAF/TVP contra seus controles pareados também somados.

A comparação entre as dosagens de DD2 em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs dos diversos subgrupos de pacientes com TVP, FVL e seus respectivos controles não mostrou aumento estatisticamente significativo em nenhum dos grupos estudados (tabela 21).

Tabela 21- Dosagens de DD2 em *pool* de plasma de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico, SAF/TVP, FVL e seus respectivos controles. Os resultados foram expressos em ng/mL.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=6)	190,4 (158,5-205,4)	186,5 (123,5-200,1)	0,70
TVP ao diagnóstico (n=9)	203,5 (153,5-237,3)	185,0 (143,0-192,7)	0,09
SAF/TVP (n=6)	194,3 (154,0-217,2)	195,5 (171,2-202,0)	0,82
FVL (n=6)	197,0 (181,3-204,8)	197,4 (185,6-201,7)	0,99

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

Na comparação das dosagens de DD2 em presença de 10.000 MPs entre os grupos não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa (P= 0,67). A comparação entre as dosagens de DD2 em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico, SAF/TVP e FVL em relação às dosagem de DD2 em todas as amostras de indivíduos saudáveis (CTR total) não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa (tabela 20).

Tabela 22- Dosagens de DD2 em *pool* de plasmas de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico, SAF/TVP, FVL e mediana do grupo controle total (CTR total). Os resultados foram expressos em ng/mL.

	Pacientes	CTR Total (n=27)	P
TVP 6 meses (n=6)	190,4 (158,5-205,4)	191,9 (123,5-202,0)	0,99
TVP diagnóstico (n=9)	203,5 (153,5-237,3)		0,15
SAF/TVP (n=6)	194,3 (154,0-217,2)		0,40
FVL (n=6)	197,0 (181,3-204,8)		0,22

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

Na análise entre as dosagens de DD2 em *pool* de indivíduos saudáveis em presença de 10.000 MPs de pacientes não houve diferença quando comparou-se os grupos TVP após 6 meses e TVP ao diagnóstico; TVP 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e nem TVP 6 meses + SAF/TVP contra seus controles pareados também somados.

5.5- Teste de geração de trombina

Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa quando compararam-se os valores da área sob a curva formada pelas densidades ópticas obtidas no TGT em presença de 10µL de MPs de pacientes com TVP ao diagnóstico, após 6 meses do diagnóstico e SAF/TVP e seus respectivos controles (Tabela 21).

Tabela 23- Valores da área sob a curva do TGT com 10µL MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP, comparados com o *pool* de seus controles pareados. Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.

	Pacientes	CTR	P
TVP 6 meses (n=10)	2012 (1446-2952)	2244 (1823-3143)	0,64
TVP ao diagnóstico (n=9)	2276 (1308-3589)	2294 (1995-3652)	0,60
SAF/TVP (n=11)	2233 (1745-2988)	2305 (1565-3075)	0,95

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

Na comparação dos valores da área sob a curva do TGT em presença de 10µL MPs entre os grupos de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e TVP/SAF não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa (P= 0,59). A comparação entre os valores da área sob a curva do TGT em presença de 10µL MPs nos diversos subgrupos de pacientes com TVP e o *pool* de todos os controles não mostrou diferença estatisticamente significativa (tabela 22).

Tabela 24- Valores da área sob a curva formada no TGT em presença de 10µL MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP comparados ao *pool* do grupo total de controles (CTR total). Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.

	Pacientes	CTR total (n=30)	P
TVP 6 meses (n=10)	2012 (1446-2952)	2278 (1565-3652)	0,35
TVP ao diagnóstico (n=9)	2276 (1308-3589)		0,82
SAF/TVP (n=11)	2233 (1745-2988)		0,75

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

Na análise entre os valores da área sob a curva do TGT em presença de 10µL MPs de pacientes não houve diferença estatisticamente significativa quando compararam-se os grupos TVP após 6 meses e TVP ao diagnóstico; TVP 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e nem TVP 6 meses + SAF/TVP contra seus controles pareados também somados.

A comparação entre os valores da área sob a curva do TGT em presença de 10.000 MPs nos diversos subgrupos de pacientes com TVP e seus respectivos controles não mostrou diferença estatisticamente significativa (tabela 23). Os valores da área sob a curva do TGT no grupo de pacientes após 6 meses do diagnóstico de TVP, apesar de não estatisticamente significativo, estava diminuído em relação ao seu grupo controle pareado.

Tabela 25- Valores da área sob a curva formada no TGT em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP comparados com o *pool* de seus controles pareados. Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.

	Pacientes	Controles	P
TVP 6 meses (n=10)	1747 (1122-2401)	2371 (1763-3143)	0,054
TVP diagnóstico (n=9)	1875 (1370-3319)	2270 (2262-2689)	0,60
SAF/TVP (n=11)	1924 (1478-2333)	2043 (1453-2643)	0,66

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

Na comparação dos valores da área sob a curva do TGT em presença de 10.000 MPs entre os grupos de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e TVP/SAF não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa (P= 0,46). A comparação entre os valores da área sob a curva do TGT em presença de 10.000 MPs nos diversos subgrupos de pacientes com TVP e o *pool* de todos os controles mostrou que os pacientes com TVP há 6 meses apresentavam valores estatisticamente diminuídos (P=0,01) (tabela 24 e figura 20).

Tabela 26- Valores da área sob a curva formada no TGT com 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP comparadas ao grupo total de controles (CTR total). Os resultados foram expressos em valores de área sob a curva da densidade óptica.

	Pacientes	CTR total (n=30)	P
TVP 6 meses (n=10)	1747 (1122-2401)	2270 (1453-3143)	0,01
TVP ao diagnóstico(n=9)	1875 (1370-3319)		0,60
SAF (n=11)	1924 (1478-2333)		0,06

Mediana (Mínimo-Máximo). Análise estatística pelo teste U de Mann-Whitney.

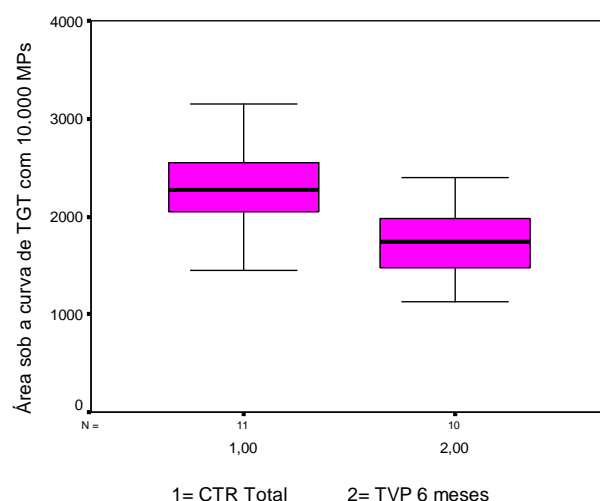


Figura 20- Representação gráfica dos valores da área sob a curva formada no teste de geração de trombina em presença de 10.000 MPs de pacientes com TVP há 6 meses comparados ao grupo total de controles (CTR total) (P= 0,01).

Na análise entre os valores da área sob a curva do TGT em presença de 10µL MPs de pacientes não houve diferença estatisticamente significativa quando comparou-se os grupos TVP após 6 meses e TVP ao diagnóstico; TVP 6 meses, TVP ao diagnóstico e SAF/TVP e nem TVP 6 meses + SAF/TVP contra seus controles pareados também somados.

6- DISCUSSÃO

A TVP resulta de um desequilíbrio entre a atividade procoagulante, anticoagulante e fibrinolítica. O fator tissular, presente em grande quantidade na adventícia dos vasos sanguíneos, exerce um papel fundamental na ativação da coagulação, que ocorre após a injúria vascular.

Contudo, quando a trombose ocorre na ausência de lesão dos vasos, a ativação ocorre por outros mecanismos. Estudos animais que empregaram a técnica de vídeomicroscopia demonstraram que, nessa situação, grande parte do fator tissular advém das MPs que se ligam às plaquetas do trombo pelos receptores P-selectina (Falati *et al*, 2003). Outro estudo que empregou um modelo murino de TVP demonstrou um aumento de MPs circulantes, que são recrutadas no trombo em formação, facilitando e amplificando a coagulação (Myers *et al*, 2003). Estudos *in vitro* (Berckmans *et al*, 2001; Nieuwland *et al*, 1997) demonstraram que em certas doenças a presença de MPs altamente procoagulantes coincidem com o aumento de marcadores de ativação, como o F1+2 (Kahn *et al*, 1975; Mallat *et al*, 2000; Ando *et al*, 2002; Lee *et al*, 1993).

A maior parte do fator tissular presente no plasma encontra-se nas MPs, que se ligam a várias células (Muller *et al*, 2003). A relação funcional entre o endotélio, as células inflamatórias e as plaquetas pode levar à coagulação sanguínea. Assim, as MPs são consideradas marcadores de ativação das plaquetas e células endoteliais, mas não há uma definição se o aumento das mesmas constitui um fator de risco para trombose.

Além disso, as MPs podem exercer uma atividade anticoagulante pela ativação da via anticoagulante da proteína C (Tans *et al*, 1991) e expressão do inibidor da via do fator tissular (Steppich *et al*, 2005).

A definição do tipo de MPs depende da utilização de anticorpos que reconheçam marcadores específicos de cada tipo celular. A citometria de fluxo é um método adequado para a quantificação e caracterização da origem celular das MPs, uma vez que possibilita marcação simultânea com vários anticorpos ligados a um fluorocromo e anexina V. Contudo, uma das limitações é que alguns marcadores das células podem não estar presentes na MP. Por exemplo, o receptor para vitronectina das células endoteliais, reconhecido em cultura celular não está presente nas MPs liberadas por essas células (Abid Hussein *et al*, 2003).

A atividade procoagulante das MPs pode ser avaliada *in vitro* pelo teste de geração de trombina, utilizando-se um substrato cromogênico ativado pela trombina, após a adição de cálcio (Berckmans *et al*, 2001; Diamant *et al*, 2002). O teste de geração de trombina permite tanto a avaliação inicial como a produzida por um período de 15 minutos de contato entre as MPs e o plasma defibrinado. As vias de ativação da coagulação podem ser diferentes, via fator tissular/fator VII ou via intrínseca da coagulação.

Vários estudos quantificaram as MPs em diversas patologias. Contudo, os métodos utilizados para separação das MPs são muito diversos, o que não permite uma comparação entre os diversos resultados.

O congelamento e estoque de plasma antes da separação das MPs pode ocasionar um aumento do seu número, pela fragmentação das próprias MPs (Rectenwald *et al*, 2005). Este é um dado que deve ser considerado na análise dos diversos estudos, e amostras de plasma de pacientes e controles devem ser submetidos ao mesmo tipo de procedimento.

Neste estudo investigamos a presença e atividade procoagulante de MPs no plasma de pacientes com TVP ao diagnóstico, após 6 meses do diagnóstico, ou associado ao diagnóstico de SAF. A idéia inicial da inclusão desses grupos de pacientes foi verificar se haveria alteração desses parâmetros em pacientes com TVP, em estágios clínicos diferentes. Além disso, poderíamos investigar se as MPs estariam envolvidas no processo de trombose venosa, decorrente da ativação celular, ou contribuindo para o processo fisiopatológico da doença. Assim, a inclusão de pacientes na fase aguda, na fase de término do tratamento, ou na presença de anticorpos antifosfolídeos, que sabidamente podem levar a um estado de hipercoagulabilidade nos pareceu interessante para investigação. Como pacientes carreadores da mutação do FVL podem apresentar um estado de hipercoagulabilidade na ausência de trombose pela resistência à proteína C ativada, também investigamos se esses indivíduos apresentavam alteração das MPs.

Um cuidado importante foi a exclusão de pacientes sob condições sabidamente associadas ao aumento de MPs, como sepsis, infecções agudas, gestação, síndrome coronariana aguda, trombocitopenia induzida pela heparina, acidente vascular isquêmico,

hipertensão grave e esclerose múltipla. Apesar de poder haver aumento de MPs na SAF, apenas foram incluídos pacientes com SAF primária, em que o critério clínico foi apenas a trombose venosa.

Nossos resultados não mostraram diferença no número de MPs nos pacientes, quando comparados aos controles pareados. No entanto, a porcentagem de MPs esteve estatisticamente aumentada nos pacientes com SAF/TVP em relação a seus respectivos controles.

O estudo de subpopulações de MPs mostrou um aumento no número de MPs de origem plaquetária nos pacientes com SAF/TVP ($P=0,01$), e uma tendência à diminuição das mesmas nos pacientes com TVP ao diagnóstico ($P=0,07$), quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Também no grupo de pacientes com TVP ao diagnóstico houve uma diminuição significativa de MPs de origem endotelial ($P=0,03$), em relação aos seus controles.

Apenas 3 estudos analisaram a presença de MPs em pacientes com TEV (Chirinos *et al*, 2005; Rectenwald *et al*, 2005, Inami *et al*, 2003). Contudo, os critérios de inclusão foram muito diferentes dos empregados em nosso estudo, uma vez que apenas incluímos pacientes com TVP espontânea, e nesses estudos foram selecionados pacientes com TVP associada à neoplasia, cirurgia recente, uso de estrogênio, idade avançada, entre outros fatores de risco em mais de 50% dos casos.

Um dos estudos analisou 25 pacientes com TVP ao diagnóstico e mostrou um aumento de MPs endoteliais sem aumento de MPs plaquetárias, sugerindo um aumento da ativação endotelial. Se por um lado o período entre a coleta e a separação das MPs foi muito maior que o nosso, que foi imediato, por outro, as amostras não foram congeladas. Também vale ressaltar que na citometria não houve o emprego de IgGs como controles negativos, o que é passível de crítica. Apesar de 48% dos pacientes terem sido submetidos à cirurgia, esses resultados foram os mesmos quando esses pacientes foram excluídos da análise estatística. Contudo, a atividade procoagulante dessas MPs não foi investigada. O achado do número normal de MPs plaquetárias foi considerado consequência de seu consumo no processo trombótico, por sua ligação aos leucócitos, demonstrado pelo aumento da formação de conjugados plaquetas-leucócitos (Chirinos *et al*, 2005).

Outro estudo analisou a presença de MPs em 22 pacientes ao diagnóstico de TVP proximal de membros inferiores, na presença de fatores de risco adquiridos. As MPs foram separadas por ultracentrifugação, e não se observou aumento das mesmas nos pacientes (Rectenwald *et al*, 2005). Esses dados favorecem a hipótese de que as MPs não estavam aumentadas nos pacientes com TVP, uma vez que a ultracentrifugação favorece não só a formação como a concentração das MPs na amostra, o que poderia levar a uma superestimação do número de MPs, pois exossomos seriam incluídos nessa contagem. Um dado importante é que os resultados observados na citometria foram validados com o emprego de *beads* na quantificação das MPs, o que oferece uma maior precisão à metodologia.

A avaliação de 6 pacientes com EP demonstrou um aumento no número de MPs plaquetárias, mas essa análise foi realizada em amostras de lavados plaquetários, e em nosso estudo analisamos *pellet* de MPs separado de plasma pobre em plaquetas. O método de quantificação foi muito preciso, pois utilizam *beads* para quantificação e mensuração do tamanho de MPs, mas por outro lado não utilizaram controles para excluir debris na contagem total. Assim como nos outros estudos de pacientes com TVP, os pacientes apresentavam fatores de risco adquiridos (Inami *et al*, 2003).

Além dos critérios clínicos, torna-se difícil a comparação entre os nossos resultados e os obtidos nesses estudos, uma vez que os métodos empregados tanto para a separação das MPs como alguns dos anticorpos utilizados na citometria foram diferentes.

A metodologia empregada neste estudo permite a detecção de MPs com grande especificidade, pois em todas essas análises foi feita uma dupla marcação para anticorpos específicos para os tipos celulares e anexina V, confirmando tratar-se de MPs. A não inclusão da anexina V possibilita a inclusão de debris na contagem das mesmas. Assim, a contagem de MPs não deve ter sido subestimada, além de que essa metodologia já está bem estabelecida na literatura. O único grupo de pesquisadores que empregou o mesmo método para quantificação e caracterização de MPs que o nosso estudo, nunca estudou pacientes com TEV. Contudo, este grupo realizou inúmeros estudos em pacientes com alteração da coagulação, como cirurgia cardíaca, meningococcemia, falência de múltiplos órgãos. (Nieuwland *et al*, 1997).

Particularmente na detecção de MPs de plaquetas, incluímos o anticorpo CD61 que reconhece a GPIIIa, pois a GPIb é muito susceptível à proteólise, podendo subestimar o número de MPs (Nieuwland *et al*, 1997).

Além disso, apenas o nosso estudo buscou uma caracterização mais ampla segundo a origem celular das MPs, já que em todos os trabalhos feitos até o momento a caracterização baseou-se apenas nas MPs de origem plaquetária, leucocitária e endotelial (Joop *et al*, 2001).

Apesar de termos congelado nossas amostras, tanto os controles como os pacientes foram expostos a essa mesma variação metodológica. Além disso, seria impossível a realização dessas análises individualmente em cada uma das coletas quando os pacientes foram incluídos no estudo.

Os nossos resultados não confirmaram nossa hipótese inicial de que os pacientes com TVP teriam um aumento de MPs. Surpreendentemente, verificamos uma diminuição do número endoteliais nos pacientes com TVP aguda. Não podemos afastar a possibilidade de que as MPs tenham sido consumidas durante o episódio agudo de trombose, e somente estudos prospectivos poderiam esclarecer melhor esse ponto.

Essa hipótese foi bem demonstrada em pacientes com disfunção múltipla de órgãos, nos quais a diminuição da quantidade de MPs no plasma estava associada à menor geração de trombina *in vitro* (Joop *et al*, 2001). Contudo, esses pacientes apresentavam aumento da ativação da coagulação *in vivo*, demonstrado pelo aumento de F1+2 e complexo TAT no plasma. Também se verificou uma relação inversa entre o número de MPs e a concentração de complexos TAT. Uma das hipóteses é que as MPs aderem à várias células circulantes, resultando numa redução de seu número, mas levando a uma expressão aumentada de fator tissular e citocinas. Assim, diversos mecanismos de geração de trombina podem ser induzidos pelas MPs, em patologias diferentes (Joop *et al*, 2001).

Imaginávamos que os monócitos estimulados no processo trombótico levariam à formação de MPs, que por sua vez expressariam o fator tissular, contribuindo para o processo fisiopatológico da oclusão vascular. Contudo, isso não pode ser confirmado, visto

que a porcentagem dessas MPs estava próxima de zero. Além disso, não detectamos evidência de expressão de fator tissular em nenhum dos subtipos de MPs. Talvez tenha ocorrido um *clearance* aumentado das mesmas, ou realmente as mesmas não estejam envolvidas no processo da trombose. A análise de MPs em pacientes submetidos a circulação extracorpórea para cirurgia de revascularização, empregando a mesma metodologia do nosso estudo, encontrou resultados semelhantes no plasma, em contraste com um aumento no material coletado da região pericárdica (Nieuwland *et al*, 1997).

Para avaliar uma possível relação entre a atividade procoagulante das MPs e o estado de coagulação *in vivo*, avaliamos a concentração do F1+2 da protrombina no plasma dos pacientes com TVP após 6 meses, com SAF/TVP e nos indivíduos com FVL. Contudo, não detectamos nenhuma correlação entre os valores do F1+2, número e subtipo de MPs.

Apenas verificamos que os pacientes com SAF/TVP apresentavam uma diminuição significativa ($P=0,008$) da concentração do F1+2 em relação aos controles. Apesar de pacientes com SAF/TVP apresentarem maior risco de retrombose decorrente da hipercoagulabilidade, como os mesmos estavam sob anticoagulação, isso pode explicar a menor concentração de F1+2 nesses pacientes.

Posteriormente realizamos vários ensaios *in vitro*, com o objetivo de analisar a ação procoagulante das MPs, pois mesmo que não estivessem em número aumentado poderiam apresentar este efeito.

Numa primeira fase, estimamos a atividade procoagulante total das frações de MPs, sem nenhuma padronização em relação ao número de MPs, através dos testes de geração de trombina, F1+2 e DD2.

A amostra de MPs dos pacientes com SAF/TVP mostraram uma menor geração de F1+2 ($P=0,001$), sugerindo um efeito inibitório da coagulação. Os resultados com DD2 também mostraram uma tendência para esse efeito.

Os ensaios com a amostra de MPs dos pacientes com TVP ao diagnóstico mostraram um aumento na geração de DD2 tanto em relação ao grupo controle pareado ($P=0,008$) como em relação ao grupo controle total ($P=0,0001$). Isso evidencia a

importância de se analisar globalmente os resultados obtidos, pois apesar do número de MPs em pacientes com TVP aguda não estar aumentado, as mesmas parecem ter um efeito procoagulante maior que nos controles.

Numa segunda fase, o objetivo foi a análise da atividade da MP, de acordo com o número de MPs, isto é, 10.000 MPs. Com isso pudemos avaliar o potencial procoagulante próprio das MPs. Esse procedimento não foi realizado anteriormente por nenhum dos estudos que analisaram MPs tanto em pacientes com TEV como em outras patologias.

Nossos resultados mostraram que os pacientes com TVP ao diagnóstico têm MPs com atividade procoagulante aumentada, evidenciado pelo DD2 ($P=0,008$). Como também houve um aumento do DD2 quando o número de MPs não foi corrigido na amostra, essas ações devem ter um papel aditivo ou sinérgico.

Já as MPs dos pacientes com TVP após 6 meses de tratamento mostraram um menor potencial na geração de trombina quando analisado pelo TGT ($P=0,01$). Isso poderia ter um efeito prejudicial nos pacientes, uma vez que é descrito que em indivíduos saudáveis as MPs parecem ter um efeito inibitório, o que poderia ser explicado pela geração basal de uma quantidade muito reduzida de trombina e conseqüente ativação da via anticoagulante da proteína C (Berckmans *et al*, 2001). Talvez, como esses pacientes não apresentam um aumento do número de MPs, o que realmente reflete a situação procoagulante *in vivo*, esse efeito deletério não esteja presente. O não aumento do F1+2 nesses pacientes favorece essa hipótese.

Concluindo nossos resultados, apesar de não mostrarem alteração no número de MPs, evidenciam a importância de estudos que avaliem a atividade das mesmas. Assim, é importante a caracterização do tipo e do papel do fragmento liberado pela célula, nas diversas situações clínicas. Medidas terapêuticas que possam esclarecer a respeito da atividade de elementos como as MPs talvez possam ser úteis na profilaxia da recorrência do evento trombótico.

7- CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, concluímos que:

- As MPs podem desempenhar um papel na fisiopatologia da TVP ao diagnóstico, e sua diminuição pode ser o reflexo de um consumo aumentado. A atividade procoagulante aumentada das MPs favorece essa hipótese;
- A atividade procoagulante das MPs depende de variáveis, como o número de MPs, e isso deve ser considerado na análise dos resultados dos estudos;
- A atividade procoagulante das MPs pode estar aumentada ou diminuída dependendo da fase ou situação associada a TVP;
- O aumento da porcentagem de MPs nos pacientes com SAF/TVP, particularmente as de origem plaquetária, pode ter relação com o risco de trombose. Por outro lado, devido ao fato destes pacientes estarem sob anticoagulação, talvez as MPs possam não estar sendo consumidas neste processo de hipercoagulabilidade. Como a atividade procoagulante das MPs desses pacientes está diminuída, poderiam inclusive ter um efeito protetor;
- Os pacientes após 6 meses do diagnóstico de TVP, apesar de apresentarem aumento não significativo de MPs, com tendência à diminuição da atividade procoagulante, evidenciam diminuição de F1+2 no plasma. Isso pode sugerir um efeito protetor das MPs;
- Os resultados sugerem que os estudos que avaliam MPs, devem incluir não somente a enumeração e caracterização do subtipo das mesmas, mas também análise funcional, pois não há uma relação linear entre esses parâmetros.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* 2003;1(11):2434-43.

Ando M, Iwata A, Ozeki Y, Tsuchiya K, Akiba T, Nihei H. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int* 2002; 62:1757-63.

Antiplatelet Trialist' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--III: Reduction in venous thrombosis and pulmonary embolism by antiplatelet prophylaxis among surgical and medical patients. *BMJ* 1994; 308:235-46.

Barry OP, FitzGerald GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost* 1999; 82(2):794-800.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn RP, Hack CE, Sturk, A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85:639-47.

Blann AD, Lip GY, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost* 1997; 77:1077-80.

Blann AD, Noteboom WM, Rosendaal FR. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br J Haematol* 2000; 108:191-3.

Bugert P, Pabinger I, Stamer K, Vormittag R, Skeate RC, Wahi MM *et al.* The risk for thromboembolic disease in lupus anticoagulant patients due to pathways involving P-selectin and CD154. *Thromb Haemost* 2007; 97(4):573-80.

Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol* 1997; 96(3):458-63.

Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E *et al.* Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 3;45(9):1467-71.

Chong BH, Murray B, Berndt MC, Dunlop LC, Brighton T, Chesterman CN. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* 1994; 83: 1535-41.

Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104(10):3190-7

Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol* 2007; 44:62-9.

Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HFG, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to the intercellular signaling device. *J Cell Sci* 2000; 113: 3365-74.

Diamant M, Nieuwland R, Berckmans RJ, Pablo RF, Smit JWA, Sturk A *et al.* Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes. *Circulation* 2002; 106:2442-7.

Dodson PM, Haynes J, Starczynski J, Farmer J, Shigdar S, Fegan G *et al.* The platelet glycoprotein Ia/IIa gene polymorphism C807T/G873A: a novel risk factor for retinal vein occlusion. *Eye* 2003; 17:772-7.

Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E *et al.* Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 197:1585-98

Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Op Cell Biol* 2004; 16:415-21.

Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL. Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J Biol Chem* 1993; 268(20):14586-9.

Giesen PLA, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT *et al.* Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2311-5.

George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N *et al.* Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986; 78(2):340-8

Hanson PO, Werlin L, Tibblin G, Eriksson H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. *Archives Internal Medicine* 1997; 157:1665-70.

Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood* 1999; 94:3791-9.

Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *New England Journal of Medicine* 1990; 323:1512-6.

Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Roger M, Abdelnoor M. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 1994; 72(5):666-71.

Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 30(2):111-42.

Inami N, Nomura S, Kikuchi H, Kajiura, T, Yamada K, Nakamori H *et al.* P-selectin and platelet-derived microparticles associated with monocyte activation markers in patients with pulmonary embolism. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003; 9 (4): 309-16.

Katopodis JN, Kolodny L, Jy W, Horstman LL, De Marchena EJ, Tao JG *et al.* Platelet microparticles and calcium homeostasis in acute coronary ischemias. *Am J Hematol* 1997; 54(2):95-101

Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med* 2004; 32(3):818-25

Jilma B, Eichler HG, Vondrovic B, Breiteneder H, Kyrle PA, Kirzeweger E *et al.* Effects of desmopressin on circulating P-selectin. *Br J Haematol* 1996; 93:432-6.

Jilma B, Fasching P, Rutchner C, Rumplmayr A, Ruzicka S, Kapiotis S *et al.* Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 1996; 76:328-32.

Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE *et al.* Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 2000; 85(5):810-20.

Kahn I, Zucker-Franklin D, Karpatkin S. Microthrombocytosis and platelet fragmentation associated with idiopathic/autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1975; 31:449-60.

Lee VJ, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res* 1993; 72:295-304.

Leoncini G, Bruzzese D, Signorello MG, Armani U, Piana A, Ghiglione D *et al.* Platelet activation by collagen is increased in retinal vein occlusion. *Thromb Haemost* 2007; 97(2): 218-27.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999; 99(3):348-53.

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM *et al.* Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101:841-3.

Maffei FHA. Trombose venosa profunda dos membros inferiores: incidência, patologia, fisiopatologia e diagnóstico. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshioda WB, Rollo HA. *Doenças Vasculares Periféricas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1995. p. 841-62.

Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(33):23111-8.

- Muller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E *et al.* Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003;17(3):476-8.
- Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG *et al.* P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 2003, 38: 1075-89
- Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG *et al.* Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997; 96:3534-41.
- Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG *et al.* Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930-5.
- Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M *et al.* Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* 1998; 80:388-92.
- Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of eicosapentaenoic acid on platelet activation markers and cell adhesion molecules in hyperlipidemic patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003; 17(3):153-9.
- Olas B, Lundell K, Holmsen H, Fukami MH. Biochemical properties of platelet microparticle membranes formed during exocytosis resemble organelles more than plasma membrane. *FEBS Lett* 2002; 525: 29-32.
- Owens MR. The role of platelet microparticles in hemostasis. *Transfus Med Rev* 1994; 8(1):37-44.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-703.
- Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AW *et al.* An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med* 2003; 348: 1435-41.

Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet C, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of MHC class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 1997; 8:2631-45.

Rectenwald JE, Myers DD Jr, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, Schmaier AH, Wakefield TW. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost.* 2005; 94(6):1312-7.

Robertorye RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *American Journal of Hematology* 2001; 68:256-68.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85:1504-8.

Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82(2):610-9.

Siljander P, Carpen O, Lassila R. Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. *Blood* 1996; 87(11):4651-63.

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Archives Internal Medicine* 1998; 158:585-93.

Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thrombosis and Haemostasis* 2005; 93 (1): 35-39.

Tans G, Rosing J, Christella M, Thomassen LGD, Heeb MJ, Zwaal RFA *et al.* Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood* 1991; 77:2641-8.

Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-castagnoli P *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 1999; 147:599-610.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:569-79.

Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 1996; 87:1409-15.

Van Hultejn H, Briet E, Koch C, Hermans J, Bertina R. Diagnostic value of fibrinopeptide A and beta-thromboglobulin in acute deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Acta Med Scand* 1982; 211:323-30.

Van Wijk MJ, Svedas E, Boer K, Niewland R, VanBavel E, Kublickiene KR. Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from normal pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1686-93

Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP *et al.* Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84:3691-9.

Zeiger F, Stephan S, Hoheisel G, Pfeiffer D, Ruehlmann C, Koksche M. P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11(8):723-8.

9- ANEXO

ANEXO 1- Revisão do aumento do número de micropartículas em várias desordens

Origem celular	Desordem (aumento de MPs)
Células endoteliais	Síndrome coronariana aguda
	<i>Diabetes mellitus</i>
	Hipertensão (severa)
	Infarto do miocárdio
	Esclerose múltipla
	Hemoglobinúria paroxística noturna
	Preeclâmpsia
	Doença das células Sickle
	Lupus eritematoso sistêmico
	Púrpura trombocitopênica trombótica
Eritrócitos	Vasculite
	Doença das células Sickle
Granulócitos	<i>Diabetes mellitus</i>
	Preeclâmpsia
	Artrite reumatóide
	Sepse/falência múltipla dos órgãos
Leucócitos	Sepse
	Trauma (severo)
	Trombose venosa
Linfócitos	Placas ateroscleróticas
	<i>Diabetes mellitus</i> (tipo 2)
	HIV
	Preeclâmpsia
Monócitos/macrófagos	Síndrome coronariana aguda
	Síndrome do anticorpo antifosfolípide
	Placas ateroscleróticas
	Câncer de pulmão
	<i>Diabetes mellitus</i> (tipo 2)
	Hipertensão
	Falência múltipla dos órgãos (sepsis meningocócica)
	Artrite reumatóide
	Doença das células Sickle

Plaquetas	Síndrome coronariana aguda
	Aterosclerose
	Câncer
	Doença congênita do coração cianótico com policitemia
	Diabetes
	Coagulação intravascular disseminada
	Síndrome uremica hemolítica
	Trombocitopenia induzida pela heparina
	Hipertensão
	Síndrome nefrótica idiopática
	Púrpura trombocitopênica idiopática
	Infarto cerebral
	Infarto do miocárdio
	Síndromes mieloproliferativas
	Hemoglobinúria paroxística noturna
Plaquetas	Doença arterial periférica
	Embolismo pulmonar
	Artrite reumatóide
	Doença das células Sickle
	Estenose (severa)
	Inflamação sistêmica pós trauma ou sepse
	Angina instável
	Uremia

Berckmans RJ. Microparticles: coagulation and inflammation [Tese - Doutorado]. Amsterdam (Netherlands): University of Amsterdam; 2004.

10- APÊNDICES

APÊNDICE 1

Questionário – Data da Coleta: __/__/__

Nome do Paciente:	
HC:	Data de nascimento:
Idade:	Sexo: <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino
Origem étnica: <input type="checkbox"/> Caucasóide <input type="checkbox"/> Afro-descendente Obs.: _____	
História Pessoal de trombose venosa profunda (TVP), ou acidente vascular cerebral (AVC), ou infarto agudo do miocárdio (IAM): <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Qual?.....	
História Familiar de TVP, ou AVC, ou IAM: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Qual?.....	
Grau de parentesco:.....; Idade:	
Sofre de algumas destas doenças:	
Hipertensão arterial: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Diabetes: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Síndrome Convulsiva: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Hipotireoidismo: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Neoplasia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Doença Renal <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Doença Hepática <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Síndrome do anticorpo antifosfolípido <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Outras _____	
Fumo: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Quanto tempo?	Quantos cigarros?
Faz uso de algum medicamento? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Qual?	
Faz uso de anticoncepcional? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Qual?	
Quanto tempo?	Via:
Faz Terapia de Reposição Hormonal? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Qual medicamento?	
Quanto tempo?	
Está grávida? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Quantas semanas?	
Quantas gestações anteriores?	Complicações: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Qual?
Abortos: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Quantos?	Presença de pré-eclâmpsia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Puerpério: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data do parto:
Já passou por alguma cirurgia?	

APÊNDICE 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: “AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICROPARTÍCULAS PLAQUETÁRIAS CIRCULANTES EM PACIENTES COM TROMBOSE VENOSA PROFUNDA”

Responsáveis pelo projeto: MARIANE CRISTINA FLORES NASCIMENTO

Profa. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

Eu, _____, idade:

_____, Data de Nascimento: _____, RG: _____, HC: _____,

Residente à Rua/Av.: _____

_____, Telefone: _____

E-mail: _____; concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade : _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____,

Residente à Rua/Av. _____,

_____ Telefone: _____.

Trata-se de uma pesquisa que tem como objetivo o estudo de componentes denominados micropartículas plaquetárias (MPs). Com este estudo será avaliada a relação destes componentes com sujeitos que foram diagnosticados como portadores de trombose, e comparados com voluntários saudáveis, além de determinar a sua atividade coagulante.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença.

Deveremos coletar 30 mL de sangue para a análise bem como os outros exames para comprovar alguma influência na coagulação. Eventualmente, o senhor(a) poderá ser reconvocato a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame.

Os riscos a que o voluntário estará sujeito ao participar do estudo são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá ao voluntário outros riscos importantes.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em conseqüência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
2. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor(a) concorda que este material possa ser armazenado.
5. Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor(a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo deverá ser novamente submetido à apreciação do CEP.
6. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
7. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: (19) 3788.8936)

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Mariane Cristina Flores Nascimento

Aluna de pós-graduação
Fone: (19) 3251-8882

Profa.Dra. Joyce M. Annicchino-Bizzachi

Orientadora
Fone (19) 3788-8755

APÊNDICE 3

Valores individuais da quantificação de MPs, F1+2 em plasma e em MPs, DD2 e TGT

Paciente	Grupo	MPs/L (x 10 ⁶)	F1+2plasma (nmol/L)	F1+2 MPs (nmol/L)	DD2 Corrigido (ng/mL)	TGT Corrigido (área)
Adiara	TVP ao diagnóstico	154,0	-	-	203,52	3119
Elzira	TVP ao diagnóstico	161,2	-	-	237,31	1875
Gilberto	TVP ao diagnóstico	155,9	-	-	153,46	2609
José	TVP ao diagnóstico	124,7	-	-	225,68	2563
Antônio	TVP ao diagnóstico	165,6	-	-	191,2	1501
Juliana	TVP ao diagnóstico	570,0	-	-		1628
M ^a	TVP ao diagnóstico				179,64	
Aparecida	TVP ao diagnóstico	97,3	-	-	225,68	3319
Rosalina	TVP ao diagnóstico	380,5	-	-	204,56	1736
Sivaldo	TVP ao diagnóstico	318,2	-	-	178,62	1370
Willian	TVP ao diagnóstico	4196,2	0,25	0,34	190,08	1400
Ana	TVP 6 meses	513,0	0,08	0,32	196,17	1953
Claudinei	TVP 6 meses	277,3	0,26	0,32	190,62	1830
Helena C.	TVP 6 meses	379,0	0,45	0,35	168,47	1576
Ione	TVP 6 meses	140,8	0,52	0,46	158,49	1978
Luciana	TVP 6 meses	188,6	0,34	0,46	-	1472
Lucimar	TVP 6 meses	726,8	0,37	0,33	205,35	1122
Lucimeire	TVP 6 meses	589,7	0,14	-	-	2123
Rodrigo	TVP 6 meses	485,6	0,44	0,36	-	2401
Sandra	TVP 6 meses	180,5	0,40	0,36	-	1663
Sheila	TVP 6 meses					

Paciente	Grupo	MPs/L (x 10 ⁶)	F1+2plasma (nmol/L)	F1+2 MPs (nmol/L)	DD2 Corrigido (ng/mL)	TGT Corrigido (área)
Adriana	SAF	185,1	0,62	0,28	-	1975
Elizabete	SAF	479,6	0,11	0,32	194,85	1824
Geralda	SAF	402,7	0,65	0,34	-	1478
Mara	SAF	298,3	0,22	-	-	1502
M ^a Ivanilda	SAF	218,6	0,11	-	-	2088
M ^a Madalena	SAF	772,0	0,05	0,28	193,80	1924
M ^a Viana	SAF	134,3	0,05	0,33	217,24	2333
Rafael	SAF	164,8	0,06	0,44	195,12	1890
Regiane	SAF	320,1	0,07	0,31	189,55	1980
Ricardo	SAF	334,8	0,05	0,26	154,00	2310
Roseli	SAF	282,1	-	-	-	1623
Aline L.	FVL	61,0	0,36	-	204,82	-
Andréa	FVL	665,2	0,35	0,28	186,62	-
Guacira	FVL	26,3	-	-	-	-
Helena L.	FVL	573,2	0,40	0,29	199,59	-
Lucia	FVL	333,6	0,84	0,29	197,49	-

Paciente	Grupo	DD2 sem correção (ng/mL)	TGT sem correção (área)
Adiara	TVP ao diagnóstico	258,08	3589
Elzira	TVP ao diagnóstico	340,11	1947
Gilberto	TVP ao diagnóstico	225,05	2811
José Antônio	TVP ao diagnóstico	280,1	3007
Juliana	TVP ao diagnóstico	379,01	2745
M ^a Aparecida	TVP ao diagnóstico	190,12	2276
Rosalina	TVP ao diagnóstico	225,98	2237
Sivaldo	TVP ao diagnóstico	217,38	1670
Willian	TVP ao diagnóstico	222,74	1308
Ana	TVP 6 meses	203,51	1459

Paciente	Grupo	DD2 sem correção (ng/mL)	TGT sem correção (área)
Claudinei	TVP 6 meses	155,99	2032
Helena C.	TVP 6 meses	184,55	1931
Ione	TVP 6 meses	174,27	1991
Luciana	TVP 6 meses	183,58	1874
Lucimar	TVP 6 meses	184,55	1446
Lucimeire	TVP 6 meses	212,71	2480
Rodrigo	TVP 6 meses	157,71	2952
Sandra	TVP 6 meses	197,56	2932
Sheila	TVP 6 meses	179,92	2378
Adriana	SAF	143,82	2191
Elizabeth	SAF	-	2013
Geralda	SAF	-	1799
Mara Palha	SAF	175,99	2233
Mª Ivanilda	SAF	161,14	2757
Mª Madalena	SAF	-	2685
Mª Viana	SAF	-	2662
Rafael	SAF	-	2167
Regiane	SAF	150,8	2988
Ricardo	SAF	181,87	2654
Roseli	SAF	-	1745